

# 폐글리세롤을 탄소원으로 트레할로스 생산을 위한 재조합 대장균 배양 조건 최적화

소흥, 김성배, 김창준\*

경상대학교 화학공학과 및 공학연구원

Received: June 28, 2016 / Revised: August 11, 2016 / Accepted: August 11, 2016

## Statistical Optimization of Culture Conditions for Enhanced Production of Trehalose by Recombinant *Escherichia coli* Using Crude Glycerol

Hong So, Sung Bae Kim, and Chang-Joon Kim\*

Department of Chemical Engineering and ERI, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

This study aimed to optimize the culture conditions of recombinant *Escherichia coli* expressing *otsBA* using crude glycerol for the enhanced production of trehalose. The effects of culture temperature and isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-induction were investigated. Trehalose production and cell growth were highest when cells were cultured at 37°C and induced with IPTG. The concentrations of IPTG, validamycin A, and NaCl were optimized using Box-Behnken design. Statistical analyses of the experimental data revealed that the concentrations of IPTG and NaCl had significant effects on trehalose production, but that of validamycin A did not. Contour plot analysis and model calculation showed that the highest amount of trehalose could be produced at 298 mM NaCl and 0.1 mM IPTG. Under these optimal conditions, the optical density at 600 nm and trehalose production were  $5.4 \pm 0.2$  and  $304 \pm 15$  mg/l, respectively.

**Keywords:** Crude glycerol, recombinant *Escherichia coli*, *otsBA*, trehalose

## 서론

트레할로스는 두 개의 글루코오스가  $\alpha$ - $\alpha$ -1,1-glycosidic linkage(글리코시딕 결합)로 연결된 비환원성 이당류로 감미료, 화장품 보습제, 단백질 의약품 보존제로 널리 사용된다[10]. 초기 트레할로스 생산은 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 발효에 의해 이루어졌으나 상대적으로 수율이 낮고 생산단가가 높다는 문제점이 지적되어 효소 전환 공정으로 대체되었다[19]. 그러나 미생물 유전자 조작 및 대사공학 기술의 발달로 고생산성 균주개발이 가능해지고 농업 또는 산업현장에서 발생하는 부산물을 고부가가치 유용물질 생산에 사용할 수 있다는 장점으로 인하여 미생물공정을 이용한 트레할로스 생산이 재조명되고 있다[16].

산업현장에서 다양한 형태의 부산물이 발생하는데, 폐글

리세롤이 대표적인 예이다. 바이오디젤 생산공정의 부산물인 폐글리세롤은 최근 들어 과잉으로 발생하여 이를 정제하여 판매하는 것이 가격 경쟁력을 상실하고 있을 뿐만 아니라 새로운 환경오염 유발원으로 대두되어 미국을 포함한 전세계적으로 이의 처리 방안을 고심하고 있다[27]. 폐글리세롤을 미생물 배양 기질로 사용하여 바이오 연료(케미컬) 생산을 위한 많은 시도가 있었으나[6], 다른 탄소원을 사용하는 경우에 비하여 발효기간이 길고 생산성이 낮다는 지적을 받아왔다[3, 6, 24]. 폐글리세롤에는 지방산 염, 메탄올 및 나트륨/칼륨 등의 불순물들이 다량으로 존재한다[3, 24]. 폐글리세롤 용액에 존재하는 나트륨/칼륨 농도가 세포 성장을 저해할 정도로 높지 않고[3, 13] 대장균을 포함한 많은 미생물들이 메탄올에 어느 정도 내성이 있기 때문에[3, 9, 13, 24] 미생물 배양에 있어서 폐글리세롤에 존재하는 나트륨/칼륨과 메탄올은 크게 문제되지 않는다. 지방산 염은 그 자체가 독성물질로 작용하여 미생물의 성장을 억제할 수 있다[3, 24]. 뿐만 아니라 폐글리세롤을 멸균하는 과정에서 폐글리세롤에 포함된 지방산 염이 고온에서 산화되어 다량의 퍼옥사이드

### \*Corresponding author

Tel: +82-55-772-1787, Fax: +82-55-772-1789

E-mail: cj\_kim@gnu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

로 전환된다[13]. 피옥사이드는 미생물의 성장을 저해하거나 살균력을 갖는 물질이다[1, 4]. 따라서 미생물 배양용 기질로 폐글리세롤을 사용하기 위해서는 폐글리세롤에 존재하는 지방산 및 피옥사이드에 저항성을 갖는 미생물을 개발하거나[13] 폐글리세롤로부터 지방산을 제거하는 것이 바람직하다[15].

본 연구팀은 대장균의 트레할로스 생합성 오페론(*otsBA*)을 과발현 시키는 재조합 대장균을 개발하였다. 기존 연구[11]에서 배지에 첨가되는 NaCl 농도를 증가시킴에 따라 재조합 균주의 세포 파쇄액으로부터 얻은 조효소(crude enzyme)의 트레할로스 생합성 효소 활성뿐만 아니라 트레할로스 분해 효소(trehalase) 활성도 증가함을 발견하였다. 트레할라이즈(trehalase) 저해제인 발리다마이신(validamycin A)을 배지에 첨가한 경우 트레할로스 생산량이 월등히 증가하였다. 뿐만 아니라 트레할로스 생산량은 *otsBA*의 induction을 위하여 첨가되는 isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 농도에 상당한 영향을 받았다[11]. 본 연구는 지방산이 제거된 폐글리세롤(pretreated crude glycerol, 전처리 폐글리세롤)을 탄소원 기질로 사용하여 트레할로스 생산균주 배양을 통해 트레할로스 생산 가능성을 조사하고 상기 핵심 배양 조건들을 최적화함으로써 트레할로스 생산성을 높이는 데 그 목적이 있다. 이를 위하여 전처리 폐글리세롤이 함유된 배지에서 생산균주의 세포생장 및 생산거동을 조사하였다. 배양온도와 IPTG 첨가에 따른 영향을 조사하였다. 반응표면 분석법을 사용하여 NaCl, 발리다마이신 및 IPTG 농도를 최적화하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

주식회사 M 에너지 사(Pyeong-taek, Korea)로부터 폐글리세롤을 입수하였다. 포도당, 효모추출액(yeast extract), 트립톤(tryptone)은 Difco 사(USA)로부터 구입하였고 IPTG, 엮피실린(ampicillin), 및 기타 시약들은 Sigma-Aldrich 사(USA)에서 구입하였다. 발리다마이신(순도, 66%)은 (주) 한농(Korea)에서 입수하였다. 대장균 발현 벡터인 *pTrc99A* (Amersham Bioscience, USA)에 대장균 트레할로스 생합성 오페론(*otsBA*)이 삽입된 재조합 플라스미드(*PT-otsBA*)는 본 실험실에서 제작되었다[11].

### 폐글리세롤의 전처리

Pyle 등[15]이 제안한 방법에 따라 폐글리세롤 용액으로부터 지방산 염을 제거하였다. 폐글리세롤 용액에 산을 첨가하여 용액의 pH를 낮추면 지방산 염이 지방산으로 전환된다. 이를 저온에 방치 시 용해도가 낮은 지방산이 침전되는

데, 여과 또는 원심분리에 의해 폐글리세롤 수용액과 지방산을 분리할 수 있다. 본 연구에서는 폐글리세롤을 탈이온 증류수와 4:1 비율로 혼합한 후, 염산(37%)을 첨가하여 혼합 용액의 pH를 3.0으로 조절하였다. 이를 4°C에서 12시간 방치한 후 생성된 침전물을 제거하기 위하여 진공펌프를 이용하여 세공크기가 0.2 mm인 멤브레인 필터(OD 47 mm, Whatman, Germany)에 용액을 통과시켰다. 필터를 통과한 여액(filtrate)은 지방산이 제거된 폐글리세롤 용액이 된다. 전처리 폐글리세롤 용액의 pH가 낮아서 이를 NaOH로 중화(pH 7.0)시킨 후 미생물 배양용 기질로 사용하였다.

### 균주, 배지 및 배양 방법

호스트 균주로 사용된 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 *PT-otsBA* 플라스미드를 도입시킨 재조합 대장균을 제작하고 이를 트레할로스 생산균주로 사용하였다. 재조합 플라스미드 및 재조합 균주 제작 방법은 참고문헌[11]에 자세히 기술되어 있다. 모든 실험에서 500 ml Erlenmeyer 플라스크에 엮피실린(최종농도, 100 mg/l)이 첨가된 50 ml 배지를 넣고 이를 진탕배양기(Jeio Tech Co., Ltd., Korea)에서 37°C, 150 rpm으로 배양하였다.

-70°C에 보관된 생산균주의 glycerol stock 400  $\mu$ l를 LB 배지에 접종하였다. 세포밀도를 나타내는 OD<sub>600</sub>가 0.6-0.8에 도달하였을 때, 접종균 2.5 ml를 본 배양용 배지에 접종하였다. 일반적으로 대장균은 20 g/l 글리세롤에서 세포생장이 저해받지 않으므로[14, 18] 본 배양 배지의 전처리 폐글리세롤 농도를 20 g/l로 고정하였다. 초기실험에서 본 배양을 위하여 M9 배지[17]에 20 g/l의 전처리 폐글리세롤, 300 mM의 NaCl 및 0.1 mM의 발리다마이신을 첨가하였고 *otsBA* 발현을 유도하기 위하여 OD<sub>600</sub>가 0.6-0.8에 도달하였을 때 IPTG(최종 농도 0.1 mM)를 첨가하였다. 그러나 최종적으로 20 g/l의 전처리 폐글리세롤이 첨가된 M9 배지를 기준배지로 하여 NaCl, 발리다마이신 및 IPTG의 최적 농도 결정을 위한 실험을 수행하였다.

### 배양 조건 최적화

배지에 첨가되는 NaCl, 발리다마이신 및 IPTG의 최적농도를 결정하기 위하여 Box-Behnken design (BBD) 실험계획법을 사용하였다. 실험이 종료된 후 버전 9.1 SAS 프로그램(SAS Institute, USA)을 이용하여 실험데이터의 회귀분석을 수행하여 통계적으로 의미있는 계수 값들을 선별하였고 이를 이용하여 이차다항식 모델을 수립하였다. 엑셀 프로그램을 이용하여 모델 방정식의 해를 구하고 Sigma plot 프로그램을 이용한 반응표면분석을 수행하여 세 성분들의 최적농도를 구하였다.

## 분석방법

세포 내에 축적된 트레할로스의 정량분석을 실시하였다. 1 ml 배양액을 채취하여 9,800 × g로 10분간 원심분리한 후 세포 펠릿(cell pellet)과 상등액(supernatant)을 분리하였다. 상등액 중의 잔류 글리세롤 농도를 측정하기 위하여 글리세롤 에세이 키트(K-GCROL, Megazyme, Ireland)을 사용하였다. 세포 펠릿을 1 ml 탈이온 증류수에 현탁시켰다. 현탁액을 포함하는 튜브를 얼음통에 넣고 세포파쇄기(ultrasonic homogenizer, Sonics & Materials, USA)의 팁을 세포현탁액에 담근 후 sonication(10초 파괴, 30초 쉬기를 두 번 반복)에 의해 세포를 파쇄하였다. 가열블럭(heating block)을 이용하여 세포 파쇄액(lysate)을 90°C에서 10분간 가열처리함으로써 세포 내에 존재하는 트레할로스 분해 효소들을 불활성화 시켰다. 세포 파쇄액을 9,800 × g로 10분간 원심하여 세포 잔사물(cell debris)을 분리한 후, 상등액만을 채취하였다. 상등액 중의 트레할로스 농도를 측정하기 위하여 트레할로스 에세이 키트(K-TREH, Megazyme, Ireland)를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 전처리 폐글리세롤을 포함하는 배지에서 *otsBA*를 발현하는 재조합 대장균의 세포 성장 및 트레할로스 생산

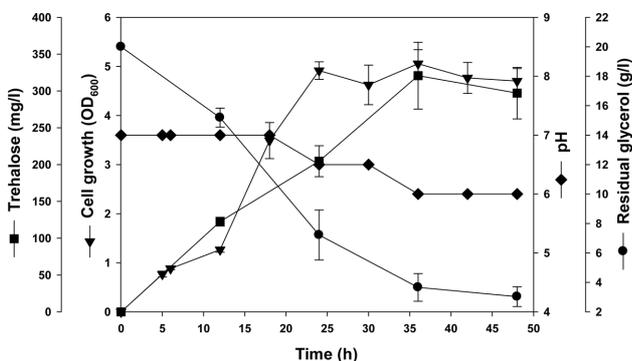
기존 연구에서 제시된 배지[11]에 순수글리세롤을 전처리 폐글리세롤로 대체하여 생산균주를 배양하고 IPTG로 induction하며 균주의 생산특성을 조사하였다. Fig. 1은 시간에 따른 세포 밀도, 글리세롤 잔류농도 및 균주가 생산하는 트레할로스 농도를 나타낸다. 생산균주는 지연기 없이 성장을 시작하여 24시간 만에 OD<sub>600</sub>가 4.9(±0.2)에 도달한 후 성장을 멈추었다. 균주의 성장과 함께 트레할로스 생합성이

시작되었고 세포 생장이 멈춘 후에도 지속적으로 생합성 되어 배양 36시간만에 최대치인 321(±45) mg/l에 도달하였다. 배양액의 pH는 배양 시작 7.0에서 시작하여 배양 종료 후 6.0으로 배양기간 동안 큰 변화가 없었다. 생산균주는 배양 48시간 만에 첨가된 글리세롤의 85%를 소모하였는데, 배양 단계별로 글리세롤의 소모속도가 달랐다. 글리세롤 속도 속도는 지수성장기(~25 h)에서 0.5 g<sup>-1</sup>l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>였고 지수성장 후반기(25~36 h)에는 0.3 g<sup>-1</sup>l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>로 감소하였고 배양말기(36 h 이후)에는 0.06 g<sup>-1</sup>l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>로 더욱 감소하였다. 세포의 지수성장 기간 동안 글리세롤 소모속도가 가장 높은 반면 지수성장 후반기에 소모속도가 감소한 것은 생산균주가 지수성장 기간 동안 세포 성장과 트레할로스 생합성에 글리세롤을 사용한 반면 지수성장기 후반기에는 세포생장이 멈추어 글리세롤이 트레할로스 생합성에만 사용되었기 때문인 것으로 판단된다. 또한 배양 말기에는 생산균주가 더 이상 트레할로스를 생합성하지 않고 세포생존을 위한 대사유지활동(maintenance)에만 글리세롤을 사용하는 것으로 여겨진다.

본 실험결과는 생산균주가 전처리 폐글리세롤을 사용하여 순수 글리세롤을 사용한 배양[11]에서와 비슷한 양의 트레할로스를 생산할 수 있음을 보여준다. 이는 고부가가치 생리활성 물질을 생산하기 위한 미생물 배양에서 전처리 폐글리세롤을 탄소원으로 활용할 수 있는 가능성을 시사한다.

### 배양온도와 IPTG induction이 트레할로스 생산에 미치는 영향

배양 온도는 미생물 성장과 생물질 합성에 영향을 미치는 주요 환경 인자이다. 일반적으로 대장균은 37°C에서 최적 성장을 보이는 반면 재조합 유전자 발현에 의한 고효율 단백질 생성은 이보다 낮은 온도에서 촉진되는 것으로 알려졌다[22]. 생산균주가 함유한 *PT-otsBA* 플라스미드에는 IPTG에 의해 유전자 발현이 유도되는 *trc* 프로모터가 존재한다. 따라서 트레할로스 생산을 위한 재조합 대장균 배양에 적합한 온도의 결정과 IPTG induction에 의한 영향을 조사하기 위한 실험을 수행하였다. Table 1은 배양 온도(37°C와 27°C)와 IPTG induction 유무에 따른 생산균주의 트레할로스 생산



**Fig. 1.** Time course of cell growth, trehalose production, glycerol consumption, and pH in flask culture of recombinant *E. coli* cells grown in M9 medium supplemented with 20 g/l pre-treated crude glycerol, 300 mM NaCl, and 0.1 mM validamycin A. The cells were induced with 0.1 mM IPTG.

**Table 1.** Effect of culture temperature and IPTG induction.

Run	Culture conditions		Cell density (OD <sub>600</sub> )	Trehalose (mg/l)
	Induction	Temperature (°C)		
1	Yes	37	5.5 ± 0.0	272 ± 4
2	No	37	5.1 ± 0.2	174 ± 13
3	Yes	27	2.9 ± 0.1	204 ± 13
4	No	27	3.7 ± 0.2	148 ± 16

\*Comparison was made after 36 h-culture.

량을 보여준다. 37°C에서 배양하는 경우(Run 1과 Run 2)가 27°C에서 배양(Run 3과 Run 4)하는 경우 보다 세포밀도와 트레할로스 생산이 높았다. Induction 하지 않은 배양(Run 2와 Run 4)에서 트레할로스 생산이 관찰되었으나 IPTG로 induction한 경우가 더 많은 트레할로스를 생산하였다. 본 실험 결과는 37°C에서 IPTG로 induction 하는 배양에서 가장 높은 세포밀도와 트레할로스 생산을 달성할 수 있음을 보여 준다.

일반적으로 야생형 대장균은 37°C에서 세포의 해당작용(glycolysis)이 촉진되어 피루브산을 생성하는 속도가 TCA 회로에 의해 이를 소모하는 속도보다 빨라 인여 피루브산이 발생한다. 이는 세포 내 아세트산 생합성을 촉진시켜 과량의 아세트산이 생성되어 분비되기 때문에 배양액의 pH가 급격히 떨어진다[5, 8, 23]. 야생형 균주와 달리 37°C에서 배양된 생산균주의 배양액에서 두드러진 pH 감소가 없었다. 생산균주가 발현하는 트레할로스 생합성 효소는 글루코오스와 UDP-글루코오스를 결합하여 트레할로스 생합성을 촉진한다. 탄소원으로 사용된 글리세롤은 생산균주에 글리세롤-3-인산 형태로 흡수된 후, 다이하이드록시아세톤 인산(DHAP)으로 전환되어 해당작용에 편입된다[25]. 트레할로스를 생합성하는 생산균주에서는 다이하이드록시아세톤 인산(DHAP)의 일부가 포도당 신생합성(gluconeogenesis)을 활성화시켜 트레할로스 전구물질인 글루코오스와 UDP-글루코오스 생합성이 촉진되는 것 같다. 이로 인해 야생형 균주보다 피루브산 생성량이 적고 궁극적으로 아세트산 생성이 최소화되어 배양액의 pH 감소폭이 적은 것으로 추측된다. 생산균주의 단위 세포당 생산량(specific productivity)은 27°C에서 배양한 경우가 37°C에서 보다 1.4배 높았는데, 이는 27°C에서 발현된 효소의 활성이 37°C에서 발현된 것보다 높기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 37°C 배양에서 얻은 세포농도가 27°C에서 얻은 것보다 1.9배 높아 37°C에서 더 많은 트레할로스가 생산된 것으로 판단되었다.

본 연구에 사용된 배지는 300 mM의 NaCl을 포함하는 고장성 용액으로 대장균에 삼투압 스트레스를 유발시켜 트레할로스 생산을 촉진시킬 수 있다[10]. 기존연구[11]에서 야생형 대장균이 고장성 배지에서 약 40 mg/l의 트레할로스를 생산하였다. 따라서 IPTG를 첨가하지 않은 배양에서 생산균주가 트레할로스를 생산한 것은 배지의 고삼투성에 기인한 것으로 판단된다. 뿐만 아니라 생산균주가 함유하는 재조합 유전자의 leaky expression으로 인하여 *otsBA* 오페론이 소량 발현되어 트레할로스 생산에 기여하였을 것으로 판단된다. 재조합 유전자가 탑재된 *pTrc99A* 벡터의 leaky expression이 몇몇 논문에서 보고되었다[12, 28]. 본 결과를 바탕으로 모든 배양을 37°C에서 IPTG로 induction 하며 실시하였다.

**트레할로스 생산 극대화를 위한 IPTG, 발리다마이신 및 NaCl 농도 최적화**

IPTG는 재조합 유전자를 induction시키고 발리다마이신은 트레할라이즈 활성 저해제[20]이며 NaCl은 삼투압 상승제로서 생산균주의 트레할로스 생산량을 증가시키는데 기여하는 핵심물질들이다. 따라서 Box-Behnken design 실험계획법을 사용하여 IPTG, 발리다마이신 및 NaCl 농도를 최적화 하기 위한 실험을 수행하였다. Table 2에 나타내었듯이, IPTG는 0.1-1 mM, 발리다마이신은 0.01-1 mM 및 NaCl은 50-450 mM 농도 범위를 선정하였고 각각 세가지 농도 범위(-1, 0, +1)에서 테스트를 수행하였다. 총 17개의 플라스크 실험을 수행하였는데, 중심점에서는 5회의 반복실험을 수행하여 실험의 재현성을 조사하였다(Table 3).

**Table 2. The levels of three independent variables for the Box-Behnken design.**

Variables	Levels		
	-1	0	+1
IPTG (mM) (X <sub>1</sub> )	0.1	0.55	1
Validamycin A (mM) (X <sub>2</sub> )	0.01	0.51	1
NaCl (mM) (X <sub>3</sub> )	50	250	450

**Table 3. Box-Behnken design matrix with experimental and predicted values of trehalose production.**

Run	Coded variable levels			Trehalose (mg/l)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Experimental	<sup>a</sup> Predicted
1	+1	+1	0	170	216
2	+1	-1	0	188	216
3	-1	+1	0	293	283
4	-1	-1	0	276	283
5	+1	0	+1	126	84
6	+1	0	-1	115	104
7	-1	0	+1	224	221
8	-1	0	-1	73	100
9	0	+1	+1	113	153
10	0	+1	-1	79	102
11	0	-1	+1	111	153
12	0	-1	-1	105	102
13	0	0	0	229	250
14	0	0	0	264	250
15	0	0	0	262	250
16	0	0	0	254	250
17	0	0	0	239	250

<sup>a</sup>Predicted values were calculated using model equation described in text, in which X<sub>2</sub> was not used.

**Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic model.**

Source	Sum of squares	D.F.	Mean square	F-value	Prob > t
Model	86967.29	9	9663.03	11.45	0.0020 <sup>b</sup>
X <sub>1</sub>	8937.85	1	8937.85	10.59	0.0140 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub>	75.65	1	75.65	0.09	0.7747
X <sub>3</sub>	5070.25	1	5070.25	6.01	0.0441 <sup>a</sup>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	5.60	1	5.60	0.01	0.9374
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	4202.11	1	4202.11	4.98	0.0609
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	63233.22	1	63233.22	74.90	< 0.001 <sup>b</sup>
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	304.50	1	304.50	0.36	0.5671
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	4935.06	1	4935.06	5.85	0.0462
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	203.06	1	203.06	0.24	0.6388
Lack of fit	4986.42	3	1662.14	7.20	0.0433
Pure error	923.55	4	230.89	-	-
Cor Total	92877.26	16	-	-	-

<sup>a</sup>Significant (values of prob > F less than 0.1).

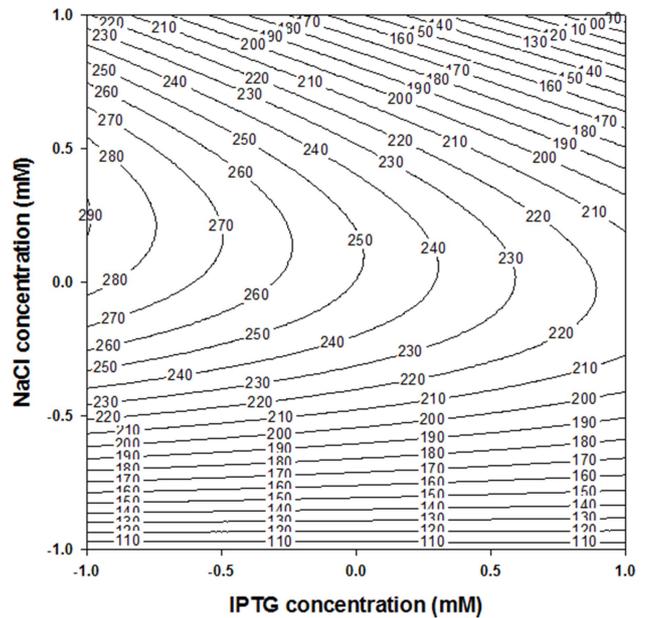
<sup>b</sup>Very significant (values of prob > F less than 0.05).

실험데이터를 이용하여 SAS 프로그램에서 완전 2차식으로 분석하였다. F-테스트와 분산분석 결과를 토대로 생성된 모델 방정식의 적합성을 평가하였고 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 일반적으로 Prob > F 값이 0.05보다 작으면 모델이 유의미하다는 것을 나타내고 0.1보다 크면 보통 무의미한 것으로 간주된다[26]. 2차식 모델의 Prob > F 값은 0.0020으로 나타나 높은 유의성을 나타내었다. 이는 ANOVA 절차에서 얻어진 모델이 적절하다는 것을 보여준다. 관측점들의 변동을 표본 회귀선들이 얼마나 잘 설명해주는가를 상대적으로 나타내는 결정계수인 R<sup>2</sup> 값도 0.9668로 높은 값을 나타내었다. 모델 방정식의 독립변수들 중에 X<sub>1</sub> (IPTG 농도), X<sub>3</sub> (NaCl 농도), X<sub>3</sub><sup>2</sup>, X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>가 유의미함을 나타내었고 X<sub>2</sub> (발리다마이신 농도) 또는 이를 포함한 항은 통계적으로 무의미하였다. 이는 IPTG 농도와 NaCl 농도가 트레할로스 생산에 영향을 미치는 핵심 변수인 반면 발리다마이신 농도의 영향은 크지 않음을 나타낸다. 따라서 예측 모델 방정식 수립 시 발리다마이신의 기여함을 고려하지 않았다. 이로부터 얻은 신뢰성 있는 모델 방정식은 다음과 같다.

$$Y = 249.780 - 33.475X_1 + 25.225X_3 - 35.225X_1X_3 - 122.477X_3^2$$

식에서 Y는 생산된 트레할로스 농도(mg/l)이고, X<sub>1</sub>과 X<sub>3</sub>는 각각 IPTG 농도와 NaCl 농도의 부호화 값(coded value)이다.

Table 3에 실험값들과 모델식을 이용하여 계산한 예측값들을 나타내었다. 두 값들이 거의 비슷하여 모델의 정확도가 높다는 것을 알 수 있다. 모델식에서 각 변수들의 계수들 부

**Fig. 2. Contour plot showing the effect of NaCl and IPTG on the production of trehalose.**

호는 상대적 영향력을 나타낸다. 양의 부호를 갖는 독립변수(X)를 증가시키면 따라 응답값(Y)이 증가함을 나타내고 음의 부호를 갖는 독립변수(X)를 증가시키면 따라 응답값(Y)이 감소함을 나타낸다. 즉, 모델식에 따르면 트레할로스 생산량을 증대시키기 위해서 X<sub>3</sub> (NaCl 농도)를 증가시키거나 X<sub>1</sub> (IPTG 농도)을 감소시켜야 한다. 그러나 어느 지점에서 최대량의 트레할로스를 얻을 수 있는지를 구체적으로 알기 위하여 구축된 모델식을 이용하여 등고선도(contour plot) 분석을 실시하였고 엑셀 프로그램을 이용하여 최적조건을 계산하였다. Fig. 2는 IPTG 농도(X<sub>1</sub>)와 NaCl 농도(X<sub>3</sub>) 변화에 따른 트레할로스 생산량을 나타내는 등고선도이다. IPTG 농도(X<sub>1</sub>)가 -1 (0.1 mM)이고 NaCl 농도(X<sub>3</sub>)가 0.24 (298 mM)일 때 가장 많은 양의 트레할로스가 생산되는 것으로 예측되었다. 발리다마이신이 통계적으로 트레할로스 생산에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 예측되었으나, 대장균 내에서 트레할라이즈의 활성을 저해함으로써 생합성된 트레할로스가 분해되는 것을 방지해 준다[11]. 따라서 모델식의 정확성을 검증하기 위한 실험에서 최소량의 발리다마이신을 첨가하였다. 즉, 298 mM NaCl, 20 g/l의 전처리 글라이세롤, 30 mM 발리다마이신이 첨가된 M9을 분 배양용 배지로 사용하여 총 5회의 실험을 수행하였다. 전 배양된 생산균주를 분 배양용 배지에 접종한 후 37°C에서 배양하였고, OD<sub>600</sub>가 0.6–0.8에 도달하였을 때 IPTG(최종 농도 0.1 mM)를 첨가하였다. 36시간 배양 후 측정된 배양액의 OD<sub>600</sub>(세포밀도)는 5.4 ± 0.2였고 트레할로스 농도는 304 ± 15 mg/l였다. 이는 예측치(291 mg/l)

와 비슷한 값으로 모델방정식의 정확도가 높다는 것을 시사한다. 한편, 최적화 전·후 NaCl과 IPTG 농도는 큰 차이가 없고 발리다마이신 농도는 1/3 수준으로 감소하였다. 최적화 전 조건에서 생산된 트레할로스 농도는 321(±45) mg/l인데, 실험 편차를 고려하면 최적화된 조건에서 생산된 트레할로스 농도와 큰 차이가 없다. 이는 발리다마이신 농도가 트레할로스 생산에 큰 영향을 미치지 않고 순수 글리세롤 또는 전처리 페글리세롤을 사용하는 배양의 최적 조건이 비슷함을 시사한다.

본 결과는 배지에 고삼투성 조건을 형성할 정도의 충분한 NaCl을 첨가하고 IPTG를 최소한으로 첨가하여 재조합 *otsBA* 오페론의 적절한 발현을 유도하는 것이 트레할로스 생산을 극대화시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 일반적으로 1 mM의 IPTG를 첨가하는 경우에 유도발현벡터에 삽입된 외래유전자가 최대로 발현하는 것으로 알려져 있다[21]. 그러나 외래 유전자의 과도한 발현은 오히려 생산균주의 대사 회로를 교란시킴으로써 세포에 대사부담(metabolic burden)을 가중시켜 세포생장 및 생산성의 저해를 초래할 수 있다 [2, 7]. 본 결과는 재조합 대장균 배양을 통한 트레할로스 생산에서 반응표면 분석법을 사용하여 배양조건을 최적화함으로써 트레할로스 생산량을 극대화시킬 수 있음을 시사한다.

## 요 약

전처리 페글리세롤을 기질로 사용한 재조합 대장균 배양에서 트레할로스 생산성에 영향을 미치는 핵심 변수들을 도출하고 반응표면 분석법을 사용하여 트레할로스 생산을 극대화하기 위한 최적조건을 탐색하였다. 37°C에서 IPTG로 induction 하는 배양이 27°C 또는 induction 하지 않은 배양에 비하여 세포생장 및 트레할로스 생산성이 높았다. Box-Behnken design 실험계획법을 사용하여 배지중의 NaCl, 발리다마이신 및 IPTG의 농도를 최적화하였다. 통계분석결과 IPTG와 NaCl의 농도는 트레할로스 생산에 영향을 미쳤으나 발리다마이신의 영향은 크지 않은 것으로 확인되었다. 등고선도 분석을 통해 298 mM NaCl이 첨가되고 0.1 mM의 IPTG로 induction되는 배양에서 가장 많은 양의 트레할로스가 생산되는 것으로 예측되었다. 최적화된 조건에서 생산균주는 세포 밀도( $OD_{600}$ ) 5.4 ± 0.2에서 304 ± 15 mg/l의 트레할로스를 생산하였다.

## Acknowledgments

This work was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (NRF-2012R1A1A2007214).

## References

- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* **3**: 3-8.
- Carneiro S, Ferreira EC, Rocha I. 2013. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **164**: 396-408.
- Chatzifragkou A, Dietz D, Komaitis M, Zeng A-P, Papanikolaou S. 2010. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechnol. Bioeng.* **107**: 76-84.
- De La Cruz Rodriguez LC, Farias RN, Massa EM. 1990. Damage of *Escherichia coli* cells by t-butylhydroperoxide involves the respiratory chain but is independent of the presence of oxygen. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**: 510-516.
- De Mey M, De Maeseneire S, Soetaert W, Vandamme E. 2007. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 689-700.
- Dobson R, Gray V, Rumbold K. 2012. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 217-226.
- Dvorak P, Chrast L, Nikel PI, Fedr R, Soucek K, Sedlackova M, et al. 2015. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbiol. Cell Fact.* **14**: 201.
- Eiteman MA, Altman E. 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.* **24**: 530-536.
- Ingram LO. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* **125**: 670-678.
- Iturriaga G, Suarez R, Nova-Franco B. 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **10**: 3793-3810.
- Li H, Su H, Kim SB, Chang YK, Hong S-K, Seo Y-G, Kim C-J. 2012. Enhanced production of trehalose in *Escherichia coli* by homologous expression of *otsBA* in the presence of the trehalase inhibitor, validamycin A, at high osmolarity. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 224-232.
- Mansell TJ, Linderman SW, Fisher AC, Delisa MP. 2010. A rapid protein folding assay for the bacterial periplasm. *Prot. Sci.* **19**: 1079-1090.
- Nguyen ADQ, Kim YG, Kim SB, Kim C-J. 2013. Improved tolerance of recombinant *Escherichia coli* to the toxicity of crude glycerol by overexpressing trehalose biosynthetic genes (*otsBA*) for the production of  $\beta$ -carotene. *Biores. Technol.* **143**: 531-537.
- Passarinha LA, Bonifacio MJ, Queiroz JA. 2009. Application of a Fed-batch bioprocess for the heterologous production of hSCOMT in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 972-981.
- Pyle DJ, Garcia RA, Wen Z. 2008. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 3933-3939.
- Ruhel R, Kataria R, Choudhury B. 2013. Trend in bacterial trehalose metabolism and significant nodes of metabolic pathway in the direction of trehalose accumulation. *Microbiol. Biotechnol.* **6**: 493-502.

17. Sambrook J, Russel DW. 2010. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
18. Santo GME, Perdo AQ, Oppolzer D, Bonifacio MJ, Queiroz JA. 2014. Development of fed-batch profiles for efficient biosynthesis of catechol-*o*-methyltransferase. *Biotechnol. Rep.* **3**: 34-41.
19. Schiraldi C, Di Lernia I, De Rose M. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* **20**: 420-425.
20. Shigemoto R, Okuno T, Matsuura K. 1989. Effect of validamycin A on the activity of trehalase of *Rhizoctonia solani* and several sclerotial fungi. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **55**:238-241.
21. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. 2009. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Prot. Sci.* **18**: 936-948.
22. Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial. Cell Fact.* **4**: 1.
23. Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA. 2006. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3653-3661.
24. Venkataramanan KP, Boatman JJ, Kurniawan Y, Taconi KA, Bothun GD, Scholz C. 2012. Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 1325-1335.
25. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2008. Microbiology, 7th Ed. McGraw-Hill, New York.
26. Xu H, Sun L-P, Shi Y-Z, Wu Y-H, Zhang B, Zhao D-Q. 2008. Optimization of cultivation conditions for extracellular polysaccharide and mycelium biomass by *Morchella esculenta* As51620. *Biochem. Eng. J.* **39**: 66-73.
27. Yang F, Hanna MA, Sun R, 2012. Value-added uses for glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels.* **5**: 13.
28. Yoon SH, Lee YM, Kim JE, Lee SH, Lee JH, Kim JY, et al. 2006. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol. Bioeng.* **94**: 1025-1032.