Microbiol. Biotechnol. Lett. (2016), 44(3), 341–348
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1604.04002
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

폐글리세롤을 탄소원으로 *hemA*와 *otsBA*를 공동 발현하는 재조합 대장균 배양을 통한 아미노레블린산 생산

염정미[1], 디엡느구팜[1], 강대경[2], 김성배[1], 김창준[1]*
[1]경상대학교 화학공학과 및 공학연구원
[2]단국대학교 동물자원학과

Received: April 11, 2016 / Revised: June 21, 2016 / Accepted: July 14, 2016

Production of Aminolevulinic Acid by Recombinant *Escherichia coli* Co-expressing *hemA* and *otsBA* Using Crude Glycerol as Carbon Source

Jingmei Yan[1], Diep Ngoc Pham[1], Dae-Kyung Kang[2], Sung Bae Kim[1], and Chang-Joon Kim[1]*
[1]*Department of Chemical Engineering and ERI, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea*
[2]*Department of Animal Resources Science, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea*

This study aimed to develop a microbial process for producing aminolevulinic acid (ALA) using crude glycerol. In the culture of ALA-producing cells (*Escherichia coli/pH-hemA*) in a medium containing crude glycerol, the cell density and production were 1.8-fold and 1.2-fold lower than those obtained from pure glycerol, respectively. However, the cell growth and production were improved by supplementing the medium with trehalose (30 or 100 g/l). Engineered cells (*E. coli/pH-hemA/pS-otsBA*) were constructed to express *otsBA* and their culture performance was compared with that of control cells (*E. coli/pH-hemA/pSTV28*). The effects of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration and the time of induction were examined to improve the cell growth and ALA production in engineered cells cultured using crude glycerol. When 0.6 mM of IPTG was added at the beginning of the exponential growth phase, the ALA produced by cells was 2,121 mg/l, which was comparable to that from pure glycerol. The results demonstrate that *otsBA* expression endowed cells with the capacity to tolerate the toxicity of crude glycerol for direct use.

Keywords: **Crude glycerol, recombinant *Escherichia coli*, *otsBA*, aminolevulinic acid**

서 론

지속 가능한 친환경 대체 연료인 바이오디젤은 국내·외적으로 생산량이 꾸준히 증가하고 있다[38]. 바이오디젤 생산 공정에서 부산물로 발생되는 폐글리세롤 용액에는 지방산염(약 20%), 반응 후 분리되지 않은 메탄올(약 11%) 및 염(나트륨 또는 칼륨) 등의 불순물들이 상당 양 존재한다[30]. 최근 들어 폐글리세롤이 과잉으로 발생하여 이를 정제하여 판매하는 것이 가격 경쟁력을 상실하고 있을 뿐만 아니라 새로운 환경오염 유발원으로 대두되어 바이오디젤 생산이 위축되는 상황으로 변하고 있어 미국을 포함한 전 세계적으로 이의 처리 방안을 고심하고 있다[6, 38]. 따라서 폐글리세롤을 고부가가치 유용물질로 전환하는 공정을 개발한다면 폐글리세롤의 새로운 활용방안 창출을 통한 생산단가 절감은 물론 바이오디젤 생산의 활성화를 유도할 수 있다. 폐글리세롤을 미생물 발효용 기질로 사용하여 바이오 연료(케미컬) 생산을 위한 많은 시도가 있었으나[4, 19, 32, 35], 다른 탄소원을 사용하는 경우에 비하여 발효기간이 길고 생산성이 낮다[4, 30, 35]. 이는 폐글리세롤에 존재하는 불순물들이 미생물들의 생장을 억제하기 때문이다: 폐글리세롤 용액 중에 존재하는 염 성분 들은 폐글리세롤 용액의 삼투압을 높이고[10, 17], 지방산 염은 그 자체가 독성물질로 작용하여 미생물의 생장을 저해한다[4, 21, 35]. 고온의 바이오디젤 생산공정에

***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

서 오일 또는 지방산 산화로 생성된 퍼록사이드가 폐글리세롤에 존재하는데, 퍼록사이드는 세포막의 지질과산화반응(lipid peroxidation)을 촉진하여 세포막의 붕괴, 막 단백질 응집 유도를 통한 비활성화, 호흡사슬 교란을 통한 세포 사멸을 촉진시킨다[3, 12, 28]. 폐글리세롤을 멸균하는 과정에서 불순물로 포함된 지방산 염의 산화로 퍼록사이드 생성이 더욱 촉진되기 때문에 멸균된 폐글리세롤에는 다량의 퍼록사이드가 존재한다[23]. 간단한 열처리만으로도 폐글리세롤 중의 메탄올을 쉽게 제거할 수 있고 대장균을 포함한 많은 미생물들이 메탄올에 어느 정도 내성이 있기 때문에[13] 미생물배양에 있어서 폐글리세롤에 존재하는 메탄올은 크게 문제되지 않는다. 결국 폐글리세롤에 포함된 염(나트륨 또는 칼륨), 퍼록사이드, 지방산의 독성으로 인해 대장균을 비롯한 대부분의 미생물의 대사가 교란되어 세포생장이 심각하게 저해 받을 수 있다. 따라서 폐글리세롤을 미생물의 탄소원으로 사용하기 위해서는 이러한 독성 물질들에 대한 생산균주의 저항성을 높이는 것이 필수적이다.

트레할로스는 두 개의 글루코오스가 α-α-1,1-glycosidic linkage(글리코시딕 결합)로 연결되어 있는 비환원성 이당류이다[29]. 일반적으로, 대장균(*E. coli*), 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*), 코리네박테리움균(*Corynebacterium* sp.), 피로피온산 페르덴레이치균(*Propionibacterium freudenreichii*) 등의 미생물들이 열, 삼투압, 에탄올 등에 노출되어 극심한 스트레스 상황에 직면해 있을 때, 트레할로스가 세포 내에서 생합성/축적되어 이들 미생물들을 보호하는 것으로 알려져 있다[2, 14, 20, 27, 29]. 본 연구팀은 베타-카로틴을 생합성하는 재조합 대장균 배양에서 퍼록사이드, 지방산, 및 폐글리세롤을 고농도로 첨가한 배지에서 대장균 유래 트레할로스 생합성 오페론(*otsBA*)을 발현시킨 균주가 대조군 균주에 비하여 생장저해 없이 고농도의 베타-카로틴을 생합성 하는 것을 확인하였고 폐글리세롤에 포함된 불순물들 중 퍼록사이드가 미생물 생장을 저해하는 주요 핵심 성분임을 규명하였다[23]. 그러나 대조군으로 사용된 재조합 대장균이 생합성 하는 베타-카로틴이 활성산소를 포함한 과산화물을 제거하는 항산화 물질로 작용하기 때문에 폐글리세롤의 독성완화에 미치는 트레할로스의 영향을 정확히 평가하는 데 한계가 있었다.

본 연구는 세포 내 트레할로스 생합성 오페론(*otsBA*) 발현이 폐글리세롤에 대한 미생물의 저항성을 향상시키는지 여부를 조사하고 아미노레블린산(aminolevulinic acid, ALA) 생합성에 관여하는 유전자와 공동발현을 통해 폐글리세롤을 탄소원으로 사용하여 생장저해 없이 ALA를 대량생산하는 미생물공정을 개발하는데 그 목적이 있다. ALA는 피부에 국소적으로 흡수시키면 비정상적인 세포에만 반응하여 광감각제인 프로토포피린(protoporphyrin)으로 변환/축적되고 여기에 특정파장의 빛을 조사하면 비정상세포의 궤사를 촉진시킨다. 이러한 특징 때문에 ALA는 광역동 치료요법(PDT, photodynamic Therapy)에 사용된다[9]. 뿐만 아니라 ALA는 제초제 또는 인체에 무해한 살충제로도 사용이 가능하다[31]. 산업적 중요성으로 인하여 ALA를 대량생산하기 위한 생물공정개발 연구가 많이 이루어지고 있으나[5, 15, 36, 39], 폐글리세롤을 기질로 사용하여 ALA를 생산하기 위한 미생물 및 공정 개발에 대한 예는 전혀 보고된 바 없다.

본 연구에서는 아미노레블린산(aminolevulinic acid, ALA)을 생합성 하는 재조합 대장균에 *otsBA*를 추가적으로 도입한 균주를 제작하고, 이를 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 배양하며 세포생장 및 ALA 생산량을 측정하여 이를 대조군 균주의 배양결과와 비교하였다. 재조합 균주의 *otsBA* 발현을 최적화 하기 위하여 IPTG의 적정 첨가량 및 첨가시기를 결정하였다.

Table 1. Strain, plasmids, and primers used in this study.

		Description	Sources
Strains			
	E. coli DH5α	F^-, φ80d*lac*ZΔM15, Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169, *deo*R, *rec*A1 *end*A1, *hsd*R17($r_k^-m_k^+$), *pho*A, *sup*E44, λ^-, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1	
Plasmids			
	pHCEIIB	Constitutive expression vector, Amp^r	Takara Bio
	pSTV28	P_{lac} expression vector, *pACYC*184 origin, *lac*Z, Cm^r	Takara Bio
	pH-hemA	*pHCEIIB* containing *hemA* of *Rhodobacter sphaeroides*	This study
	pS-otsBA	*pSTV* containing *otsBA*	This study
Primers			
	hemA-F	5'GCATATGGACTACAATCTGGCACTC-3'	Solgent
	hemA-R	5'-AAGCTTTCAGGCAACGACCTC-3'	Solgent

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1604.04002

재료 및 방법

실험재료

주식회사 M 에너지 사(Korea)로 부터 폐글리세롤을 입수하였다. 효모추출액(yeast extract), 트립톤(tryptone)은 Difco 사(USA)로부터 구입하였고 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 엠피실린(ampicillin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 아미노레블린산 및 기타 시약들은 Sigma-Aldrich 사(USA)에서 구입하였다. *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17023으로부터 genomic DNA를 추출하고 이를 주형으로 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)에 의해 *hemA* 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자를 *Nde*I과 *Hin*dIII 제한효소로 처리한 후 동일한 제한 효소로 처리된 *pHCEIIB* (Takara Bio, Japan) 벡터에 삽입함으로써 재조합 플라스미드 *pH-hemA*를 제작하였다. 대장균 유래 *otsBA*가 삽입된 *pS-otsBA* 플라스미드는 본 실험실에서 제작되었다[18]. 사용된 유전자, 플라스미드 및 *hemA* 유전자 증폭을 위한 primer에 대한 정보를 Table 1에 나타내었다.

균주, 배지, 및 배양 방법

호스트 균주로 사용된 *E. coli* DH5α에 *pH-hemA* 플라스미드를 도입한 ALA 생산균주를 제작하였다. ALA 생산균주에 *pS-otsBA* 또는 *pSTV-28* 플라스미드를 추가적으로 도입한 균주를 제작하였다. −70℃에 보관된 glycerol stock 100 μl를 항생제가 첨가된 LB 배지 20 ml를 함유하는 250 ml 플라스크에 접종한 후 진탕배양기(Jeio Tech, Korea)에서 37℃, 180 rpm으로 배양하였다. 세포밀도를 나타내는 OD_{600}가 0.6–0.8에 도달하였을 때, 접종균 2.5 ml를 50 ml 본 배양 배지를 함유한 500 ml baffled 플라스크에 접종한 후 28℃에서 본 배양을 수행하였다. 본 배양용 기본 배지로 20 g/l(폐)글리세롤, 5 g/l 글라이신, 및 10 g/l 숙신산을 첨가한 2 × YT를 사용하였다. 필요할 경우 항생제인 엠피실린(100 mg/l) 또는 클로람페니콜(50 mg/l)을 첨가하였다. 트레할로스의 영향을 조사하기 위하여 기본 배지에 트레할로스를 농도 별로 첨가하여 균주의 생장 및 ALA 생합성 량을 측정하였다. *otsBA* 발현을 유도하기 위하여 OD_{600}가 3–4에 도달하였을 때, IPTG(최종 농도 0.2 mM)를 첨가하였다. 최종적으로 IPTG의 첨가 시점과 첨가 농도 결정을 위한 최적화 실험을 수행하였다.

분석방법

Ehrlich's reagent를 발색시약으로 사용하는 기존의 방법[15, 24, 37]을 따라 배양 상등액 중의 ALA를 정량하였다. 1 ml 배양액을 채취하여 9,800 × *g*로 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 배양 상등액 10 μl, 0.5 M 아세트산 나트륨(sodium acetate) 완충용액(pH 4.6) 1 ml, 및 50 μl 아세틸아세톤(acetylacetone)을 혼합하였다. 혼합액을 끓은 물에서 10분간 중탕하고 상온으로 냉각한 후, Ehrlich's reagent (4-dimethylamino benzaldehyde 1 g, glacial acetic acid 42 ml, perchloric acid 8 ml) 3 ml를 첨가하였다. 이를 상온에서 5분간 방치한 후 UV 분광광도계(Hewlett-packard, USA)를 이용하여 554 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 검량선과 비교하여 ALA 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

폐글리세롤의 독성 약화에 미치는 트레할로스 영향

순수 또는 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 ALA 생산 균주(*E. coli*/*pH-hemA*)를 4일간 배양한 후 생산균주의 세포 생장 및 ALA 생산량을 비교하였다(Fig. 1). 순수 글리세롤이 첨가된 배지(PG, 대조군)에서 얻은 세포밀도(OD_{600})는 18이었고 생산된 ALA 농도는 960 mg/l였다. 반면 폐글리세롤이 첨가된 배지(CG)에서 OD_{600}는 10이었고 ALA 농도는 800 mg/l였다. 본 결과는 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 세포밀도와 ALA 생산량은 순수 글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 값보다 각각 1.8배와 1.2배 낮음을 보여준다. 이는 폐글리세롤이 세포 생장을 저해함으로써 ALA 생산을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

트레할로스가 폐글리세롤의 독성을 약화시키는지 여부를 조사하기 위하여 폐글리세롤이 포함된 기본 배지에 두 농도 범위(30과 100 g/l)의 트레할로스를 첨가한 후 생산균주를 배양하였다. 30 g/l의 트레할로스를 첨가한 배지(CG + Tre-30)에서 OD_{600}는 13이었고 생산된 ALA 농도는 900 mg/l였다. 이는 트레할로스를 포함하지 않은 배지(CG)에서 얻은 세포밀도와 ALA 생산량보다 각각 30%와 12.5% 높음을 나타낸

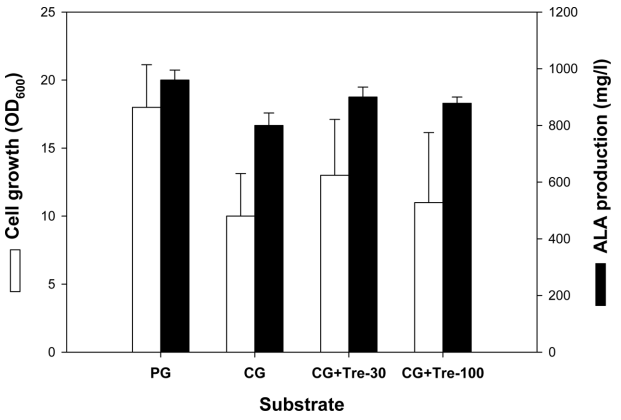

Fig. 1. Effect of trehalose on cell growth and ALA production in the medium containing crude glycerol.

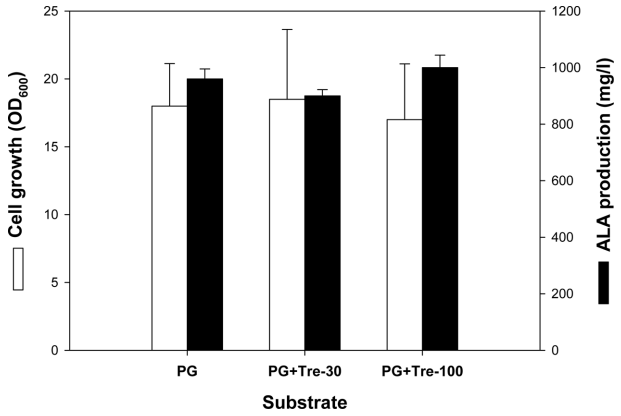

Fig. 2. Cell growth and ALA production in the medium containing pure glycerol and supplemented with different concentration of trehalose.

다. 100 g/l의 트레할로스를 첨가한 배지(CG + Tre-100)에서 OD_{600}와 ALA 농도는 각각 11과 878 mg/l로 관찰되었다. 이는 트레할로스를 첨가하지 않은 배지(CG)에서 보다 세포밀도는 10%, ALA 생산량은 9.8% 높지만 30 g/l의 트레할로스를 첨가한 배지(CG + Tre-30)에서 보다는 약간 낮음을 나타낸다. 본 결과는 트레할로스가 폐글리세롤의 독성으로부터 생산균주를 보호하고 그 효과를 극대화시키기 위해서 최적 농도로 첨가되어야 한다는 것을 시사한다.

순수 글리세롤과 트레할로스가 첨가된 배지에서 세포생장 및 ALA 생산량을 측정하였고 이를 Fig. 2에 나타내었다. 첨가되는 트레할로스의 농도를 100 g/l로 증가시킴에도 불구하고, 얻은 세포밀도와 ALA 생산량에서 큰 차이를 발견할 수 없었다. 이는 고농도의 트레할로스가 생산균주의 생장 및 ALA 생합성을 저해하지 않음을 보여주는 결과이다. 호환성 용질(compatible material)인 트레할로스는 미생물이 삼투압 스트레스 하에서 세포의 탈수를 방지하기 위해 세포 내에서 생합성되는 물질이므로 세포 내·외부에 고농도(>100 g/l)로 존재하더라도 세포 생장이 저해 받지 않는 것으로 알려졌다[16]. 이미 언급하였듯이 본 연구팀의 선행연구에 의하면 퍼록사이드가 폐글리세롤의 독성을 유발하는 핵심 성분이었다[23]. 따라서 퍼록사이드에 대한 미생물의 저항성을 높일 수 있다면 폐글리세롤에 대한 저항성도 동시에 향상될 것으로 판단되었다. Benaroudj 등[2]은 500 mM (180 g/l)의 트레할로스를 첨가한 배지에서 생장한 균주가 무기 퍼록사이드(H_2O_2)에 대한 높은 저항성을 보인 실험적 증거를 제시하였다. 기존의 보고자료와 기초실험 결과를 바탕으로 ALA 생산균주에 트레할로스 생합성 유전자인 *otsBA*를 추가로 발현시켜 트레할로스 생합성을 유도한다면 생산균주가 폐글리세롤에 대한 저항성이 향상되어 생장저해 없이 폐글리세롤을 탄소원으로 사용하여 ALA를 생산할 것으로 예상되었다.

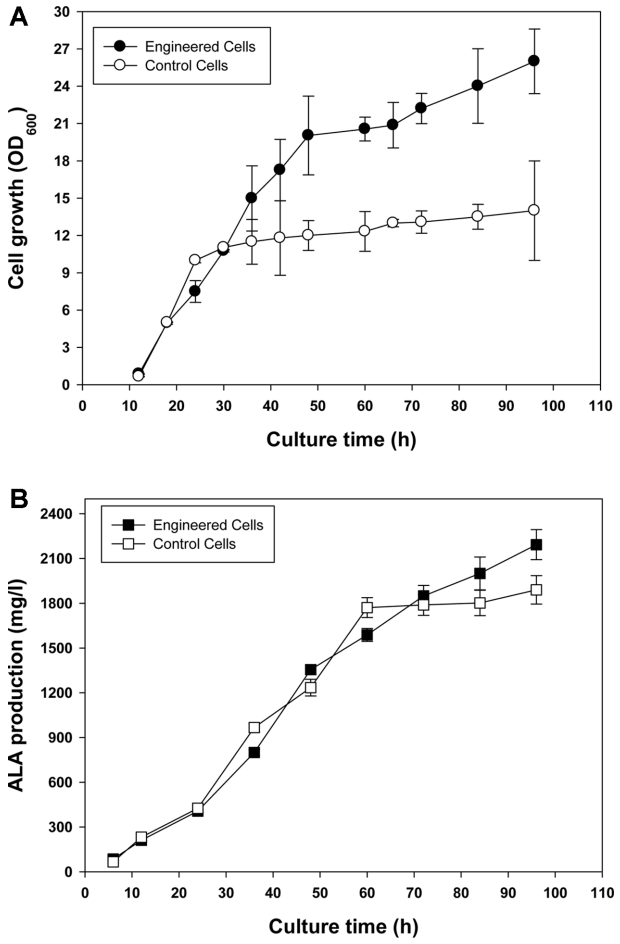

Fig. 3. Time profiles of cell growth (A) and ALA production (B) during the culture of control (open symbol) and engineered cells (filled symbol) in the medium containing pure glycerol.

*hemA*와 *otsBA*를 공동 발현하는 ALA 생산균주의 폐글리세롤에 대한 저항성 테스트

ALA를 생산하는 균주(*E. coli*/*pH-hemA*)에 *otsBA*를 추가적으로 도입한 엔지니어링 균주(*E. coli*/*pH-hemA*/*pS-otsBA*)와 벡터만을 도입한 대조군 균주(*E. coli*/*pH-hemA*/*pSTV28*)를 제작하여 두 균주의 생장 및 생산 특성을 비교함으로써 *otsBA*의 추가 발현에 따른 영향을 조사하였다. Fig. 3은 순수 글리세롤이 포함된 배지에서 두 균주의 세포 생장 및 ALA 생산거동을 보여준다. 두 종류의 균주들은 12시간의 지연기를 거친 후, 생장과 함께 ALA 생산을 개시하였다. 대조군 균주는 지수성장기를 거쳐 배양 36시간 만에 OD_{600}가 11.5에 도달하였고 이후 정체기로 접어들어 더 이상의 세포 생장이 관찰되지 않았다. 균주는 세포생장이 멈춘 후에도 지속적으로 ALA를 생산하여 배양 60시간 만에 최대량인 1,771 mg/l를 생산하였다. 한편, 엔지니어링 균주의 초기 생장은 대조군 균주의 생장과 비슷하여 배양 30시간에 OD_{600}가 10.8에 도달

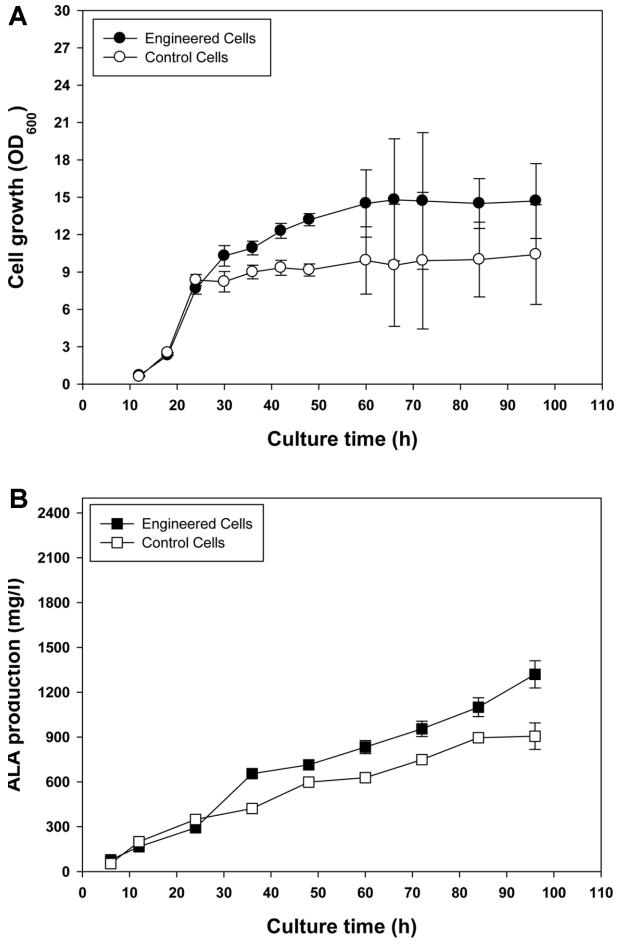

Fig. 4. Time profiles of cell growth (A) and ALA production (B) during the culture of control (open symbol) and engineered cells (filled symbol) in the medium containing crude glycerol.

하였고 배양 50시간 이후에는 생장속도가 감소되었지만 계속 생장하여 배양 96시간에 OD_{600}가 26에 도달하였다. ALA 생산은 세포생장과 함께 시작되었으며 세포 생장속도가 감소됨에 따라 그 속도가 감소하였지만 지속적인 생산이 이루어져 배양 96시간에 그 농도가 2,193 mg/l에 도달하였다.

다음은 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 두 종류의 균주를 배양하며 시간에 따른 세포 생장 및 ALA 생산 거동을 비교하였다. Fig. 4에 나타내었듯이, 대조군 균주는 24시간 동안 생장하여 OD_{600}가 8.4에 도달한 후, 생장을 멈추었다. 반면 엔지니어링 균주는 30시간까지 지수생장을 하여 OD_{600}가 10.3에 도달하였다. 그런 후, 생장속도가 감소하였으나 꾸준히 OD_{600}가 증가하여 배양 66시간 후에 14.8에 도달하였다. 두 균주 모두 세포 생장과 함께 ALA 생산을 시작하였고 세포 생장이 멈춘 후에도 ALA를 생산하였다. 대조군 균주는 배양 84시간 만에 896 mg/l의 ALA를 생산한 반면, 엔지니어링 균주는 배양 96시간 동안 1,320 mg/l를 생산하였다.

Table 2에 순수 글리세롤과 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 두 균주의 생장 및 생산 거동을 비교하였다. 순수 글리세롤이 첨가된 배지에 비하여 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 대조군 균주의 세포밀도는 1.2배 낮았고 ALA 생산량은 약 2배 낮았다. 뿐만 아니라, 최대 ALA 농도에 도달하는데 더 긴 배양 시간이 소요되어 부피생산성(volumetric productivity)은 2.8배 낮았다. 한편, 엔지니어링 균주는 순수 글리세롤 대비 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 세포생장은 1.8배, ALA 생산량은 1.7배 낮았다. 비생산성은 비슷한 수준을 유지하였지만 부피생산성은 1.7배 낮았다. 순수 글리세롤이 첨가된 배지에서 엔지니어링 균주는 대조군 균주보다 1.2배 많은 ALA를 생산하였으나 생산에 더 긴 시간이 소요되어 부피생산성은 오히려 낮았을 뿐만 아니라 단위 세포당 ALA 생산량(비생산성, specific productivity)도 대조군 균주보다 낮았다. 그런데 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 엔니지어링 균주의 세포 밀도, ALA 생산량, 부피 생산성 및 비생산성은 대조군 균주의 결과치들 보다 높아 *otsBA* 발현이 폐글리세롤에 대한 생산균주의 저항성을 향상시키는데 기여했다고 판단되었다. 그러나 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 엔지니어링 균주의 세포 밀도 및 ALA 생산량이 순수 글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 값보다 낮았으므로 이를 향상시키기 위하여 *otsBA* 발현을 최적화하기 위한 실험을 수행하였다.

Table 2. Cell growth and ALA production by control or engineered cells in medium containing pure or crude glycerol.

Strain	Glycerol type	Culture time[a] (h)	Cell growth (OD_{600})	Max. ALA (mg/l)	Specific productivity (mg-ALA/g-DCW)	Volumetric productivity (mg/l/h)
Control cells	Pure	60	12.3 ± 1.6	1771 ± 66	571.3	29.5
	Crude	84	10.0 ± 3.0	896 ± 30	379.0	10.7
Engineered cells	Pure	96	26.0 ± 2.6	2193 ± 100	290.5	22.8
	Crude	96	14.7 ± 3.0	1320 ± 91	317.4	13.8

[a]The maximum ALA was obtained at this time.

트레할로스 생합성 유전자(*otsBA*) 발현 최적화를 위한 IPTG 첨가 시기 및 첨가량 결정

hemA 발현을 위해 사용된 *pHCEIIB*는 대장균 증식에 따라 항시적으로 발현되는 벡터(constitutive expression vector) 이므로 유도인자인 IPTG가 필요없다 [15]. 그러나 *otsBA* 발현을 위해 사용된 *pSTV*28은 외래 유전자의 발현이 *lac* 프로모터에 의해 조절되는 벡터로서, IPTG에 의해 유전자의 전사가 시작되는 특징을 갖는다[34]. 따라서 *pSTV*28에 삽입된 외래 유전자의 발현 정도는 IPTG 첨가량 및 첨가 시기에 상당한 영향을 받는다[33, 36]. 유전자 발현을 최적화시키기 위하여 일반적으로 다양한 농도 범위(0.05–5 mM)의 IPTG가 첨가 되고, 동일한 첨가농도라도 발현되는 호스트 균주, 벡터, 프로모터에 따라 발현도가 다르게 나타난다 [7, 26, 33, 36]. 벡터의 특성 및 기존 연구결과를 바탕으로 IPTG의 최적 첨가량 및 첨가 시기를 결정하기 위한 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 배양 시작 직전(OD_{600} = 0), 지수생장 초기(OD_{600} = 3–4), 및 후기(OD_{600} = 7–8)에 세 농도 범위(0.2, 0.6, 1 mM)의 IPTG를 첨가하며 그 영향을 조사하였다. Table 3은 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 IPTG 첨가 시기 및 첨가량에 따른 엔지니어링 균주의 세포 생장 및 ALA 생산농도을 나타낸다. 배양시작 직전 IPTG를 첨가한 경우 IPTG 농도 증가에 따라 ALA 생산량은 감소한 반면, 지수생장 초기와 지수생장 후기에 0.6 mM의 IPTG를 첨가한 경우에 다른 농도에서보다 상대적으로 ALA 생산량이 높았다. 또한 첨가시기에 관계없이 0.6 mM의 IPTG를 첨가한 경우 다른 농도에서보다 상대적으로 세포밀도가 높았다. 한편 지수생장 초기에 1 mM의 IPTG를 첨가한 배양에서 비생산성(specific productivity)은 450.8 mg-ALA/g-DCW로 0.6 mM의 IPTG를 첨가한 배양에서 얻은 463.2 mg-ALA/g-DCW과 비슷하였으나 생산된 ALA 농도는 0.6 mM의 IPTG가 첨가된 배양에서 얻은 값의 65% 수준으로 낮았다. 이는 단위세포 당 ALA 생산능력은 우수하나 세포밀도가 낮았기 때문인 것으로 사료된다. 결과적으로 지수생장 초기에 0.6 mM의 IPTG를 첨가한 경우에 OD_{600}와 생산된 ALA 농도가 각각 16과 2121 mg/l로 최대치를 나타내었다. 최적화 전보다 세포밀도는 8.3%, ALA 생산량은 57% 향상된 값이다. 주목할만한 사실은 최적화를 통하여 얻은 ALA 생산량은 순수 글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 값과 비슷한 수준을 나타내었다는 점이다. 이는 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 엔지니어링 균주의 세포생장 및 ALA 생산이 IPTG의 첨가량과 첨가 시기에 크게 영향을 받는다는 것을 의미한다.

일반적으로 1 mM의 IPTG를 첨가하는 경우에 유도 발현 벡터에 삽입된 외래유전자가 최대로 발현되는 것으로 알려져 있으나[33, 36], 본 연구에서는 생산 균주의 세포생장 및 ALA 생산이 오히려 감소하였다. 재조합 대장균 배양에서 외래 유전자의 과도한 발현은 균주의 대사회로를 교란시킴으로써 세포에 대사부담(metabolic burden)을 주어 오히려 세포생장을 저해할 수 있다[37]. 뿐만 아니라 ALA 생산균주는 *pS-otsBA* 이외에 ALA 생합성에 필요한 *pH-hemA* 를 포함하고 있기 때문에 *otsBA* 오페론만을 과도하게 발현시키는 경우 ALA 생산량이 감소할 수 있다. 따라서 0.6 mM의 IPTG 첨가로 *otsBA* 오페론이 적절히 발현되어 세포생장, ALA 생합성, 트레할로스 생합성이 대사적 균형을 이루는 것으로 사료된다. 본 결과는 트레할로스 생합성 오페론의 발현을 최적화시킴으로써 트레할로스의 생합성을 유도하고 이의 세포 내 축적을 통해 ALA 생산성을 감소시키지 않으며 재조합 대장균이 폐글리세롤에 대한 저항성을 높일 수 있다는 것을 보여준다.

본 연구에 사용된 폐글리세롤의 순도와 불순물들의 조성을 고려한다면, 20 g/l의 폐글리세롤 첨가는 글리세롤 뿐만 아니라 6.4 mM 칼륨, 3.2 g/l 메탄올, 및 3.9 g/l 지방산도 함께 제공하는 역할을 한다[23]. 대장균에 대한 염화칼륨(KCl)의 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)

Table 3. Effect of induction time and concentration of IPTG on cell growth and ALA production by engineered cells in medium containing crude glycerol.

Cell density (OD_{600}) at the time of Induction	IPTG conc. (mM)	Cell growth (OD_{600})	ALA production (mg/l)	Specific productivity (mg-ALA/g-DCW)
0	0.2	12.9 ± 1.2	1355 ± 33	374.4
	0.6	13.9 ± 0.3	1338 ± 21	341.4
	1	12.1 ± 0.5	1157 ± 45	342.4
3–4	0.2	14.7 ± 1.1	1355 ± 55	325.8
	0.6	16.1 ± 0.7	2121 ± 24	463.2
	1	11.1 ± 0.3	1388 ± 23	450.8
7–8	0.2	12.0 ± 0.4	1055 ± 12	315.0
	0.6	13.9 ± 0.5	1124 ± 17	286.8
	1	11.3 ± 0.9	1003 ± 43	319.5

는 469 mM이고 IC_{50}(50% 저해 농도값)은 205 mM로 알려졌다[27]. 또한 1% (v/v) 이상의 메탄올이 대장균의 생장을 억제한다[13]. 이러한 점을 고려한다면 20 g/l의 폐글리세롤이 함유된 배지에 존재하는 칼륨 또는 메탄올에 의해 세포 생장이 저해 받지 않을 것으로 사료된다. 불포화지방산은 많은 미생물들의 생장을 저해하는 것으로 알려져 있으나[4, 21, 35], 대장균은 폐글리세롤에 포함된 지방산의 주성분인 고급 불포화 지방산(C12-C18)에 대한 저항성을 갖는다[8]. 그러나 폐글리세롤의 멸균과정에서 불포화지방산 산화로 발생된 퍼록사이드가 생산균주의 생장을 억제할 수 있다. 본 연구팀은 멸균 처리된 20 g/l의 폐글리세롤이 첨가된 배지에 8.1 mM의 무기 퍼록사이드(H_2O_2)와 18.8 mM 유기 퍼록사이드(*tert*-butyl hydroperoxide)가 존재하고 이들 퍼록사이드가 폐글리세롤의 독성을 유발하는 주된 성분임을 밝혔다[23]. 본 연구에서 사용한 폐글리세롤이 선행연구에서 사용한 것과 동일한 회사에서 입수한 것이므로 성분조성들은 비슷할 것으로 추측된다. 대장균은 퍼록사이드에 노출될 경우, 세포를 보호하기 위하여 항산화효소를 합성하지만 유전자가 발현되어 효소가 합성되는데 상당한 시간이 소요되기 때문에 이 기간 동안 세포는 치명적인 손상을 입게 된다[3]. 또한 합성된 항산화효소의 처리용량보다 많은 퍼록사이드가 존재할 경우, 미생물들은 심각한 스트레스 상황에 직면하여 세포 생장이 저해를 받는다[28]. 그런데 트레할로스가 축적된 효모균(Yeast)이 그렇지 않은 효모균에 비하여 퍼록사이드에 높은 저항성을 보였다[1]. 이는 트레할로스가 퍼록사이드에 의한 지질과산화 반응을 방해함으로써 효모균(*S. cerevisiae*)의 세포막을 보호해주기 때문이다[11, 22]. Oku 등[25]은 트레할로스 분자가 불포화지방산 분자의 *cis-olefin* 이중결합과 상호작용을 통해 불포화지방산 분자를 안정화 시킴으로써 퍼록사이드와의 반응성을 낮춘다고 보고하였다. 본 연구에서는 ALA 생합성 유전자와 트레할로스 생합성 유전자의 공동 최적 발현을 유도하여 ALA 생산 균주의 폐글리세롤에 대한 저항성을 향상시킴으로써 폐글리세롤을 탄소원으로 생산성의 저하없이 고부가치의 ALA를 생산할 수 있음을 밝혔다.

요 약

본 연구는 폐글리세롤을 탄소원으로 사용하여 생장저해 없이 아미노레블린산(ALA)을 생산하는 미생물 공정을 개발하는데 그 목적이 있다. 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 ALA 생산균주(*E. coli*/*pH-hemA*)를 배양하여 얻은 세포밀도와 ALA 생산량은 순수 글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 값보다 각각 1.8배와 1.2배 낮았다. 트레할로스를 첨가(30 g/l 또는 100 g/l) 함에 따라 세포생장과 ALA 생산성이 향상되었다. *otsBA*를 공동 발현하는 엔지니어링 균주(*E. coli*/*pH-hemA*/*pS-otsBA*)를 제작하여 순수 또는 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 그 성능을 평가하였다. 폐글리세롤이 함유된 배지에서 엔지니어링 균주의 세포생장 및 생산성을 향상시키기 위하여 IPTG의 최적 첨가농도 및 시기를 결정하였다. 지수생장 초기에 0.6 mM의 IPTG를 첨가한 배양에서 세포 생장과 ALA 생산량이 최대치를 나타내었다. 이때 얻은 OD_{600}(세포 밀도)와 ALA 농도는 각각 16과 2,121 mg/l였는데, 이는 순수 글리세롤이 첨가된 배지에서 얻은 생산량과 비슷한 값이다. 본 결과는 ALA 생산균주에서 트레할로스 생합성 오페론의 최적 공동 발현을 통해 폐글리세롤에 대한 저항성을 높임으로써 추가적인 전처리 없이 폐글리세롤을 탄소원으로 직접 사용할 수 있음을 보여준다.

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

1. Alvarez-Peral FJ, Zaragoza O, Pedreno Y, Arguelles J-C. 2002. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiol*. **148**: 2599-2606.
2. Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem*. **276**: 24261-24267.
3. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol*. **3**: 3-8.
4. 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.
5. Choi H-P, Lee Y-M, Yun C-W, Sung H-C. 2008. Extracellular 5-aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodopseudomonas palustris* KUGB306 *hem A* gene. *J. Microbiol. Biotechnol*. **18**: 1136-1140.
6. 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.
7. Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol*. **16**: 145-154.
8. Fay JP, Farias RN. 1975. The inhibitory action of fatty acids on the growth of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol*. **91**: 233-240.
9. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 2006. 5-aminolevulinic acid derivatives in photomedicine; characteris-

tics, application and perspectives. *Photochem. Photobiol.* **82**: 994-1015.
10. Havasi V, Sorscher E, Hurst CO, Briles TC, Yang F, Bains DG, Hassett DJ. 2008. Inhibitory effects of hypertonic saline on *P. aeruginosa* motility. *J. Cyst. Fibros.* **7**: 267-269.
11. Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio ECA. 2006. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**: 340-346.
12. Imlay JA. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 755-776.
13. Ingram LO. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* **125**: 670-678.
14. Iturriaga G, Suarez R, Nova-Franco B. 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **10**: 3793-3810.
15. Kang D-K, Kim SS, Chi W-J, Hong S-K, Kim HK, Kim HU. 2004. Cloning and expression of the *Rhodobacter capsulatus hem A* gene in *E. coli* for the production of 5-aminolevulinic acid. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1327-1332.
16. Kempf B, Bremer E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330.
17. Li C, Adler J. 1993. *Escherichia coli* shows two types of behavioral responses to osmotic upshift. *J. Bacteriol.* **175**: 2564-2567.
18. Li H, Su H, Kim SB, Chang YK, Hong S-K, Seo Y-G, *et al.* 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.
19. Liu X, Jensen PR, Workman M. 2012. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biores. Technol.* **104**: 579-586.
20. Luo Y, Li W-M, Wang W. 2008. Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? *Environ. Exp. Bot.* **63**: 378-384.
21. Maia MRG, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, *et al.* 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC. Microbiol.* **10**: 52.
22. Nery DCM, Silva CG, Mariani D, Fernandes PN, Pereira MD, Panek AD, *et al.* 2008. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**: 1408-1411.
23. 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 β-carotene. *Biores. Technol.* **143**: 531-537.
24. Nishikawa S, Watanabe K, Tanaka T, Miyachi N, Hotta Y, Murooka Y. 1999. *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 798-804.
25. Oku K, Watanabe H, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tsujisaka Y, Komori M, Inoue Y, Sakurai M. 2003. NMR and quantum chemical study on the OH-π and CH-O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12739-12748.
26. Papaneophytou CP, Kontopidis G. 2014. Statistical approach to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review. *Protein Expr. Purif.* **94**: 22-32.
27. Purvis JE, Yomano LP, Ingram LO. 2005. Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Appl. Environ. Microbial.* **71**: 3761-3769.
28. 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.
29. Ruhal 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.
30. Samul D, Leja K, Grajek W. 2014. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Ann. Microbiol.* **64**: 891-898.
31. Sasikala C, Ramana CV, Rao PR. 1994. 5-aminolevulinic acid: a potential herbicide/insecticide from microorganisms. *Biotechnol. Prog.* **1994**: 451-459.
32. Shah P, Chiu F-S, Lan C-W. 2014. Aerobic utilization of crude glycerol by recombinant *Escherichia coli* for simultaneous production of poly 3-hydroxybutyrate and bioethanol. *J. Biosci. Bioeng.* **117**: 343-350.
33. 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*. *Protein Sci.* **18**: 936-948.
34. Sugamata Y, Shiba T. 2005. Improved secretory production of recombinant proteins by random mutagenesis of *hlyB*, an alpha-hemolysin transporter from *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 656-662.
35. 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.
36. Xie L, Hall D, Eiteman MA, Altman E. 2003. Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in *Escherichia coli* using factorial design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 267-273.
37. Yang D-S, Park M-W, Lim SJ, Kim MJ, Shin Y, Park CS, *et al.* 2009. Optimizing the production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter capsulatus hem A* gene. *Korea J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 153-159.
38. Yang F, Hanna MA, Sun R. 2012. Value-added uses for glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels.* **5**: 13.
39. Zhang J, Kang Z, Chen J, Du G. 2015. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **5**: 8584.