

# 재조합 대장균의 고농도 배양과 유도조건 최적화를 통한 *Bacillus* 유래 esterase의 생산

강승훈<sup>†</sup>, 민병혁<sup>†</sup>, 최홍열, 김동일\*  
인하대학교 생명공학과

Received: March 16, 2017 / Revised: May 8, 2017 / Accepted: May 17, 2017

## Optimization of Induction Conditions for *Bacillus*-derived Esterase Production by High-cell Density Fermentation of Recombinant *Escherichia coli*

Seung-Hoon Kang<sup>†</sup>, Byung-Hyuk Min<sup>†</sup>, Hong-Yeol Choi, and Dong-Il Kim\*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

To increase the efficiency of esterase production by *Bacillus*, high cell-density culture of recombinant *Escherichia coli* through fed batch fermentation was tested. Cells were cultured to OD<sub>600</sub> of 76 (35.8 g/l DCW) with dissolved oxygen level controlled to least above 30% air saturation by supplying pure oxygen. Cells were cultured to an OD<sub>600</sub> of 90 (42.4 g/l DCW) with glucose feeding controlled to at least 1 g/l. However, the cells reached stationary phase at the late stage of culture, despite glucose being supplied. Cells were cultured to an OD<sub>600</sub> of 185 (87.3 g/l DCW) by supplying additional medium with fortified yeast extract. To increase the productivity of the recombinant protein, cell growth and esterase productivity based on induction time were evaluated. Late exponential phase induction for esterase production in fed batch fermentation resulted in maximum optical density OD<sub>600</sub> of 190 (89 g/l DCW) and maximum esterase activity of 1745 U/l, corresponding to a 5.8-fold enhancement in esterase production, compared to the early exponential phase induction. In this study, we established fermentation methods for achieving maximum production of *Bacillus*-derived esterase by optimizing IPTG induction time in high-cell density culture by supplying pure oxygen and a nitrogen source.

**Keywords:** Esterase, high cell density fermentation, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside induction, *Escherichia coli*

## 서론

Esterase, peroxidase, α-amylase를 비롯한 효소 자원은 식품, 의약품 및 섬유 산업에 이르기까지 광범위한 분야에서 사용되고 있다[1, 2]. Esterase의 주요 기능은 생체 내에서 다양한 지방질의 가수분해에 관여하지만, 효소 반응 조건에 따라 역반응인 에스터 합성반응과 트랜스 에스터 반응을 촉매하는 특성을 가지고 있다[3, 4]. 산업적 관점에서의 esterase는 주로 아미노산 합성, steroid 전환, ester 전환 및 합성 공정 등에서 효소광학분할법(enzymatic optical resolution)에 의해

D 형과 L 형이 혼합된 물질을 D 형 또는 L 형으로 분리하는데 이용된다[5, 6]. 현재까지 다양한 종류의 esterase가 발견되었는데, 주로 미생물에서 유래한 esterase가 기질에 대한 특이성, 내알칼리성, 유기용매내성, 내열성 그리고 광학선택성(enantioselectivity) 등의 특성을 갖고 있는 것으로 밝혀져 다양한 산업 분야에서 널리 이용되고 있다[7, 8]. 특히 L-ofloxacin인 levofloxacin과 D-ofloxacin이 1:1로 섞여 있는 광학이성질체에서 esterase가 갖는 광학선택성 촉매 반응을 통해 D-ofloxacin으로부터 항균활성이 월등히 뛰어난 levofloxacin을 생전환 하기 위한 시도가 이루어지고 있다[9].

대장균은 유전자 재조합 단백질 생산에 가장 널리 이용되는 균주로서 인터페론, 인터루킨, CSF (colony stimulation factor), 성장 호르몬, IGF (insulin like growth factor) 등의 생산에 사용되고 있다[10]. 뿐만 아니라 대장균은 산업적으로 유용한 효소의 발현을 위해서도 사용되고 있으며, 재조합

### \*Corresponding author

Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046

E-mail: kimdi@inha.ac.kr

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work as the first author.

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

효소가 발현된 대장균 세포를 고정화하여 생물학적 촉매로서 이용하기 위한 연구가 이루어지고 있다[11]. 이러한 고정화 세포의 이용은 재조합 효소의 분리정제 과정이 없이도 해당 효소의 사용이 가능하기 때문에 비용 측면에서 장점을 가지고 있으며, 고정화 과정을 통해 단위 공간당 높은 세포농도의 유지가 가능하여 생전환 효율을 높일 수 있다[12].

대장균에서 단백질 생산성을 향상시키기 위해서는 단위 시간, 단위 세포당 재조합 단백질의 생산성 향상과 함께 세포의 고농도 배양을 수행하여 목적 단백질이 발현된 균체를 대량으로 확보하는 것이 유리하다[13]. 대장균의 고농도 배양은 재조합 단백질의 생산성 높일 수 있을 뿐만 아니라 폐기물질과 배양 비용을 감소시킬 수 있는 장점이 있다[14]. 대장균 고농도 배양을 위해서는 유가식 배양이 일반적이며 기질저해, 산소의 고갈, acetate의 생성에 따른 대장균의 성장저하 뿐만 아니라 재조합 단백질의 생산성 저하를 극복할 수 있는 배양방법의 확립이 중요하다[15, 16].

유가식 배양에서 추가 배지의 공급 속도는 배양 과정의 주요 공정변수인 pH, DO, 포도당 농도 등의 변화에 기초하여 결정되며, 공급 방식에 따라 constant rate feeding, gradual feeding 그리고 exponential feeding 방법들이 적용된다[17, 18]. 추가 배지에 대한 공급 속도 조절을 통해 대장균의 비성장 속도를 제어할 수 있으며, 비성장 속도에 따라서 재조합 단백질의 생산성에 영향을 미친다[19]. 따라서 세포의 성장과 단백질 발현량을 모두 만족할 수 있는 최적화된 추가 배지 공급방식의 선택이 중요하다.

따라서, 본 연구에서는 유가식 배양에서 *Bacillus* 유래 esterase를 발현할 수 있는 재조합 대장균의 고농도 배양을 위해, 용존산소 농도 및 포도당 공급 조절과 추가 배지 조성의 강화를 시도하였다. 추가적으로 단백질 발현 시기의 조절에 따른 esterase 생산성 평가를 통해 최적 induction 시기를 확인하여 최대 esterase 생산성을 갖는 배양 조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

본 연구에는 *E. coli* BL21/pET24b를 기반으로 *Bacillus pumilus* 유래의 esterase (DQ339137.1)가 cloning된 균주를 보령제약 중앙연구소로부터 분양받아 사용하였다. 종배양 발효는 LB 배지를 사용하였으며, 본배양 발효를 위한 기본 배지(substrate medium) 조성은  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  2 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.75 g/l, Citric acid 0.85 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.7 g/l, Glucose 10 g/l, Yeast extract 2 g/l, trace metal solution 5 ml ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.25 g/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1 g/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/l,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.23 g/l,

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 g/l)이며, 추가 기질 공급 배지는 glucose 500 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  15 g/l, yeast extract 2 g/l를 사용하였다. 질소원의 강화를 목적으로 사용된 강화배지(fortified medium)의 조성은 기본 배지 조성을 기반으로 yeast extract의 농도를 2 g/l에서 20 g/l로 상향 조절하였으며, 추가 기질 공급 배지는 glucose 500 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  15 g/l, yeast extract 20 g/l를 사용하였다.

### 발효기 운전 조건

1차 종배양을 위해 kanamycin 40 mg/l가 포함된 LB 배지 5 ml에 1%(v/v)로 접종 후 12시간 동안 250 rpm, 37°C에서 진탕배양하였다. 2차 종배양은 50 ml의 배지에 접종하여 1차 종배양과 동일 조건으로 진행하였다. 본배양을 위해 5-L fermentor (Kobiotech, Korea)에 2 L의 working volume으로 배지를 준비한 후 2차 종배양액을 5% (v/v)로 접종하였다. 본배양을 위한 발효기 운전 조건은 37°C, 통기속도 4 vvm, 교반속도 600 rpm을 유지하였으며, 산소농도가 감소하는 시점에서 교반속도를 800 rpm까지 단계적으로 증가시킨 후 100% 산소를 간헐적으로 공급하여 30% 이상의 산소 농도가 유지되도록 설정하였다. 유가식 배양을 위해 30분 마다 포도당 농도를 확인하고 포도당 농도가 1 g/l 이하를 유지하도록 feeding 배지의 공급속도를 조절하였다. 본배양 중 pH의 조절은 암모니아수(28%)를 사용하였고, 배양 중 발생하는 foam의 제거를 위해 antifoam A (Sigma, USA)와 Adecanol LG 109 (Asahi Denka, Japan)를 첨가하였다. Esterase의 발현을 위해 IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)를 1 mM로 첨가하여 induction하였다.

### 세포 성장 및 glucose 농도 측정

균체량의 측정은 spectrophotometer (Agilent 8453, Agilent Technologies, USA)을 사용하여 OD<sub>600</sub>에서의 흡광도를 측정하였고, 흡광도와 건조 균체량의 표준곡선에 의해 결정하였다. 흡광도와 건조 균체량의 표준곡선을 구하기 위해 대장균 배양액을 LB 배지를 사용하여 단계적으로 희석한 후 각각의 흡광도를 측정하였고, 8,000 ×g에서 15분간 원심분리 후 침전된 균체를 80°C dry oven에서 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였다. 배양액 내의 glucose는 glucose analyzer (YSI2000 select, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 세포 내 esterase 활성 측정

Induction에 의해 대장균 세포 내에서 발현된 esterase activity 측정을 위해 세포를 OD<sub>600</sub> 5로 희석한 후 그 중 200  $\mu$ l를 취하여 원심분리 한 후 상등액을 제거하고, ethanol과 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)가 각각 4:95의 비율로 혼합된 reaction buffer 500  $\mu$ l를 첨가하였다. 효

소 반응을 위한 기질로 acetonitrile에 용해된 10 mM *p*-nitrophenyl caprylate (PNPC) 10  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 개시하고 상온에서 1분간 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성 측정은 효소반응을 통해 생성된 산물인 pNP (*p*-nitrophenol)의 표준곡선을 통해, 1분당 1  $\mu$ mol의 pNP를 생성하는 효소활성을 1 unit으로 정의하였다. 발효 부피 당 esterase의 생산성은 시간별로 측정된 세포 중량당 esterase의 활성값에 해당 시점의 세포 농도를 반영하여 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 용존산소 농도 조절에 의한 세포 성장

호기성 균주의 발효 시 배지내의 용존산소는 미생물의 산소 요구량을 만족시키기 위한 중요 인자 중 하나이다. 산소는 수용액상에서 용해도가 낮기 때문에 미생물의 산소 요구량을 만족시킬 수 있도록 통기속도와 교반속도를 증가시키거나, 추가적인 순수 산소(pure oxygen)의 공급 또는 산소의 분압을 조절하여 고압환경을 유지함으로써 용존산소를 조절한다[20, 21]. 산소 소비 속도는 결국 세포 성장속도와 비례하기 때문에 산소의 부족은 미생물 대사를 저해하고 성장속도를 저하시키는 원인으로 작용할 뿐만 아니라, 재조합 단백질의 발현에도 중요한 인자로 작용한다[22].

세포농도가 증가함에 따라 나타나는 산소 고갈의 문제를 해결하기 위해 교반속도 600 rpm, 통기속도 4 vvm의 발효 조건을 기반으로 추가적으로 순수 산소를 solenoid valve와 연결하여 배양액 중 용존산소 농도를 air saturated condition

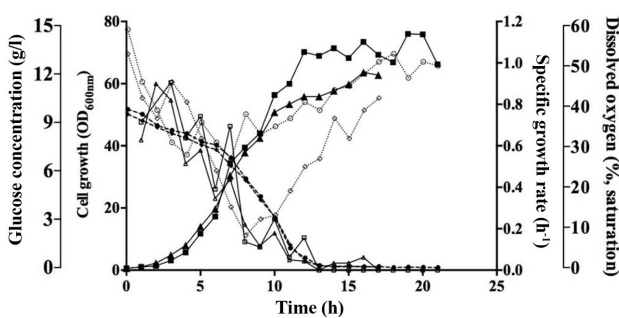
의 30% 이상으로 유지하여 세포 성장을 비교하였다(Fig. 1).

실험 결과 순수 산소를 공급하지 않은 경우 배양 17시간째 산소 부족이 관찰되었으며, 이때 최종 OD<sub>600</sub>는 63 (29.7 g/l DCW)로 확인되었다. 반면 용존산소 농도가 30% 이상이 유지되도록 순수 산소를 공급하는 경우 최종 OD<sub>600</sub>는 76 (35.8 g/l DCW)으로 세포 농도가 증가함을 확인하였고, 배양시간은 20시간 이상 유지되었다. 그러나 순수 산소 공급에 의한 세포 성장은 유의한 증가율을 보이지 않았는데, 이는 당을 비롯한 영양원의 공급에 제한이 발생하기 때문인 것으로 판단되었다.

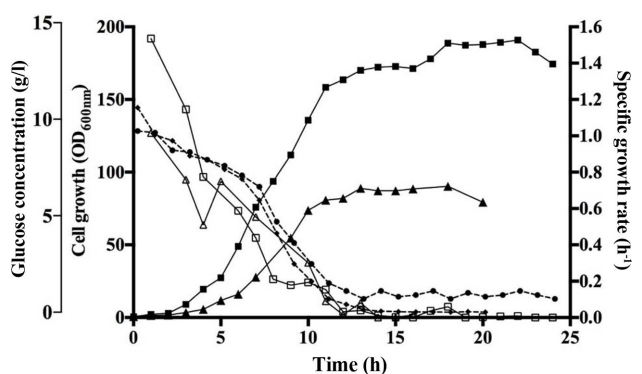
### 포도당과 yeast extract 공급에 의한 세포 성장

대장균 고농도 배양을 위해서 추가적인 당의 공급과 공급 속도는 세포 성장에 있어서 매우 중요한 인자가 된다[23]. 당의 공급이 세포의 성장을 따라가지 못하면 영양원의 부족으로 세포 성장과 단백질 합성이 원활하게 이루어질 수 없고, 과량의 당이 공급되면 대사과정의 부산물로서 acetic acid 생산이 증가하여, 세포 성장과 단백질 생산에 부정적인 결과를 초래하므로, *E. coli* 고농도 배양을 위해서는 당 공급 속도의 조절이 필수적이다[24]. 따라서 배양 중 포도당 농도를 확인하여 포도당 농도가 1 g/l 이하가 되도록 공급속도를 조절하여 배양을 진행하였다. 포도당 공급 조절을 통해 얻은 최대 OD<sub>600</sub>는 90 (42.4 g/l DCW)이었으며 이전 실험과 비교 시 활발히 생장이 이루어지는 초기 세포 성장을 크게 향상시킬 수 있었다(Fig. 2). 그러나 배양 후반인 10시간 이후에는 세포의 생장이 정체되는 현상을 확인할 수 있었다.

배양 후반 세포 생장의 정체를 극복하기 위해 공급배지의



**Fig. 1. Time course changes of cell growth, specific growth rate, glucose concentration and dissolved oxygen with and without pure oxygen supply during fermentation.** ▲, cell growth profiles without pure oxygen supply; ■, cell growth profiles with pure oxygen supply; △, specific growth rate without pure oxygen supply; □, specific growth rate with pure oxygen supply; ◆, glucose concentration without pure oxygen supply; ●, glucose concentration with pure oxygen supply; ◇, dissolved oxygen without pure oxygen supply; ○, dissolved oxygen with pure oxygen supply.



**Fig. 2. Time course changes of cell growth, specific growth rate and glucose concentration with substrate medium or fortified medium as an additional feeding media.** ▲, cell growth profiles with substrate medium; ■, cell growth profiles with fortified medium; △, specific growth rate with substrate medium; □, specific growth rate with fortified medium; ◆, glucose concentration with substrate medium; ●, glucose concentration with fortified medium.

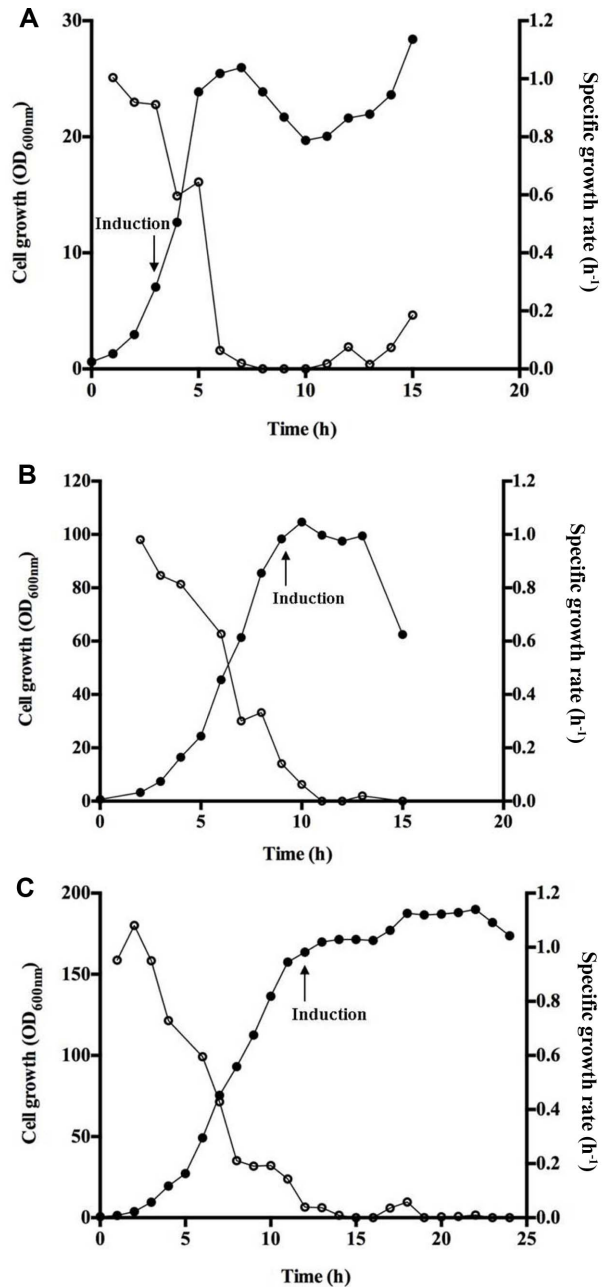
yeast extract를 강화하여 배양을 진행하였고, 공급배지로 사용된 yeast extract 성분이 배양 후반에 필요한 당 이외의 영양원으로 사용되어 세포 성장을 극대화 시킬 수 있기를 기대하였다. 다른 연구의 경우에도 yeast extract의 첨가를 통한 질소원의 공급이 세포의 성장을 향상시키고, 외래 단백질 생산성을 높였다는 결과가 보고된 바 있다[25]. 따라서 배양 후반의 성장 저하를 극복하기 위해 본배양 배지의 yeast extract 농도를 2 g/l에서 20 g/l로 강화하였고, feeding media에도 20 g/l의 yeast extract를 첨가하여 배양을 진행하였다. Yeast extract의 강화에 의해 확인된 최대 세포성장은 OD<sub>600</sub> 185 (87.3 g/l DCW)로서 포도당 농도의 조절을 통해 얻은 세포 성장에 비해 세포 농도가 2배 이상 증가할 뿐만 아니라 지수성장기의 비성장속도 역시도 0.759 h<sup>-1</sup>에서 1.146 h<sup>-1</sup>로 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

**IPTC 첨가 시기에 의한 esterase 생산성**

대장균 배양에서 IPTG에 의한 목적 단백질 생합성의 유도는 세포안에 제한적으로 존재하는 자원을 세포의 기능 유지를 위한 단백질의 합성과 목적단백질의 합성에 동시에 사용함으로써 대사과정에 부하를 유발하여 세포의 성장을 저해하는 효과를 나타낸다[26]. 따라서 목적단백질의 생산을 위한 induction 시기는 세포의 성장 시기와 농도를 고려하여 결정되어야 하며, 최대의 생산성을 확보할 수 있는 적절한 시기에 이루어져야 한다. 본 연구에서는 앞서 확립된 고농도 배양이 가능한 유가식 배양 조건을 기반으로 최적의 IPTG induction 시기를 결정하기 위해 세포의 지수 성장기 초기, 중기, 후기에 해당하는 3 h, 9 h, 12 h에 IPTG induction을 진행하여 발현 유도 시기에 따른 세포의 성장과 esterase 생산성을 확인하였다.

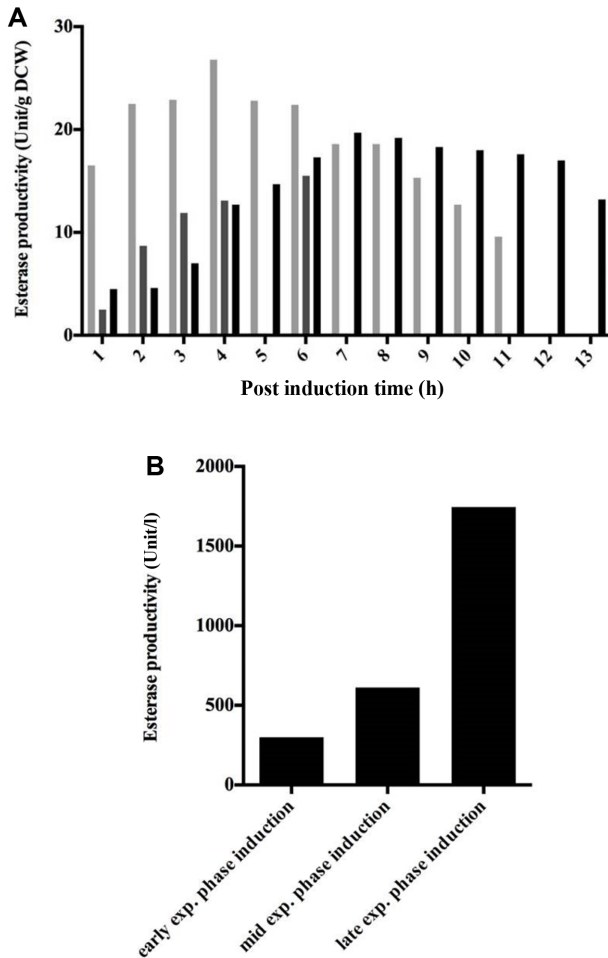
세포의 배양 조건은 앞서 확립된 고농도 세포 배양을 위한 유가식 배양 조건을 기초로 진행하였고, 1 mM의 IPTG를 첨가하여 induction을 시도하였다.

지수 성장기 초반인 OD<sub>600</sub> 7 (3.2 g/l DCW)에서 induction을 유도한 경우 최대 OD<sub>600</sub> 28 (13.2 g/l DCW)로 가장 낮은 세포 성장을 나타내었다(Fig. 3A). 세포의 비성장속도는 접종 후 induction 직전까지 0.911 h<sup>-1</sup> 이상을 유지하였으나, induction 후 0.596 h<sup>-1</sup>으로 감소하고 induction 3시간 이후부터는 세포의 성장이 정체되는 것으로 확인되었다. 지수 성장기 중반인 OD<sub>600</sub> 98 (46.2 g/l DCW)에 induction을 유도한 경우 IPTG 첨가 후 세포의 비성장 속도가 0.627 h<sup>-1</sup>에서 0.301 h<sup>-1</sup>로 감소하였고, induction 4시간 후에는 세포의 성장이 정체되었으며, 최대 세포성장은 OD<sub>600</sub> 104 (49 g/l DCW)로 확인되었다(Fig. 3B). 특히 induction 유도 후 6시간째에는 급격한 세포 사멸이 이루어져 induction이 세포의 성장에 심각한 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 지수 성장



**Fig. 3. Time course changes of cell growth and specific growth rate with induction during the early exponential phase (A), mid exponential phase (B) and late exponential phase (C).** ●, cell growth profiles; ○, specific growth rate; arrows indicate the induction times using IPTG.

기 후반인 OD<sub>600</sub> 163 (77 g/l DCW)에서 induction을 유도한 경우 induction 전후의 비성장 속도는 각각 0.191 h<sup>-1</sup>, 0.193 h<sup>-1</sup>으로 induction에도 불구하고 세포의 성장속도에는 큰 영향을 미치지 않았으며, induction 후 13시간까지 점진적으로



**Fig. 4. (A) Time course profiles of relative esterase activity after induction during early exponential phase (gray), mid exponential phase (dark gray) and late exponential phase (black) and (B) Volumetric productivity of recombinant esterase production depending on induction time.**

세포가 성장하여 최대 OD<sub>600</sub> 190 (89 g/l DCW)까지 증가하였다(Fig. 3C).

Induction 이후 시간에 따른 esterase의 상대 활성 변화를 확인한 결과, 지수성장기 초기에 induction을 유도한 경우 4시간에 26.8 mU/g DCW로 esterase의 단위 세포당 활성이 증가하였으나, 배양 시간이 길어질수록 점차 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4A). 그러나 배양 후반 induction에 의해 정체되었던 세포의 성장이 다시 개시되었음에도 불구하고, 단위 세포당 esterase 활성은 오히려 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3A, Fig. 4A). 또한 지수 성장기 초기에 induction을 유도한 경우 단위 세포당 esterase의 활성이 가장 높았으나, 부피당 활성 측면에서는 가장 낮은 것으로 확인되었다. 지수 성장기 중반에 induction을 유도한 경우에는 지수성장기 초

반에 induction을 유도한 경우에 비해 세포 농도 측면에서는 약 3.7배 정도 높게 성장하였으나, 단위 세포당 활성은 15.5 mU/g DCW로 오히려 낮아졌다(Fig. 4A). 그러나 부피당 활성 측면에서는 2.03배의 생산성 증가가 확인되었다(Fig. 4B). 지수 성장기 후반에 induction을 유도한 경우 유도 후 7시간까지 단위 세포당 esterase의 활성이 증가하였으며, 최고 상대 활성은 19.7 mU/g DCW로 확인되었다. 단위 세포당 상대 활성 측면에서는 지수 성장기 초반에 induction을 유도한 경우와 비교하여 약 1.4배 낮은 수치를 보였으나, 부피당 생산성 측면에서는 지수 성장기 초반 대비 5.8배, 지수 성장기 중반 대비 2.8배의 생산성 증가가 확인되었다. 선행 연구에서 회분식 배양에서의 대장균 발현 시스템을 사용한 재조합 *EcoRI* 단백질의 발현 유도에 있어서 지수성장의 중간 시점에서 1 mM의 IPTG를 사용한 조건이 최적 생산성을 나타내는 것으로 확인하였다[27]. 그러나 본 연구에서 적용한 유가식 배양조건에서는 지수성장기 후반에 induction을 하는 경우 최대 생산성을 갖는 것으로 확인되었고, 이는 유가식 배양을 통한 고농도 배양에 있어서 균체량의 증가가 재조합 단백질의 생산성에 중요한 영향을 미침을 시사한다.

이상의 결과를 통해 *Bacillus* 유래 esterase의 생산을 위한 대장균배양에 있어서, 최고 OD<sub>600</sub> 185 (87.3 g/l DCW)까지 고농도 배양이 가능한 유가식 배양 조건을 확립하였고, 단백질 발현 유도시기에 따른 esterase의 생산성을 확인하여, 지수성장기 후반에 단백질 발현을 유도하는 경우 최대 생산성을 나타냄을 확인하였다.

## 요 약

본 연구에서는 *Bacillus* 유래 esterase를 생산할 수 있는 재조합 대장균을 사용하여 유가식 배양을 이용한 고농도 균체 배양을 통해 esterase 생산성을 극대화하고자 하였다. 유가식 배양 중 순수 산소의 공급을 통해 용존산소를 30% 이상 유지한 경우와 포도당농도를 1 g/l 이상 유지한 경우 각각 OD<sub>600</sub> 76 (35.8 g/l DCW)과 OD<sub>600</sub> 90 (42.4 g/l DCW)까지 균체량을 증가시킬 수 있었다. 포도당의 공급에도 불구하고 배양 후반에 세포의 성장이 정체되는 현상을 극복하기 위해 yeast extract가 강화된 추가 배지의 공급을 시도하였으며, 그 결과 OD<sub>600</sub> 185 (87.3 g/l DCW)까지 고농도 균체 배양이 가능함을 확인하였다. 단백질 생산 수율의 향상을 위해 성장 시기에 따라 induction에 의한 세포 성장과 esterase 생산성을 평가하였고, 그 결과 대수 성장기 후반에 induction을 유도한 경우 세포 성장 측면에서는 최대 OD<sub>600</sub> 190 (89 g/l DCW)까지 고농도 균체 배양이 가능함을 확인하였다. Esterase 생산성 측면에서는 대수 성장기 초반에 induction을 유도한 경우에 비해 최대 5.8배 생산성이 증가됨을 확인

할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 순수산소와 질소원의 공급을 통해 확립된 대장균 고밀도 배양방법을 기초로 IPTG 유도시간을 최적화 함으로써 *Bacillus* 유래 esterase의 최대 생산성을 확보할 수 있는 배양방법을 확립하였다.

## Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant (No. NRF-2013M3A9B6075887).

## References

- Adrio JL, Demain AL. 2014. Microbial enzymes : tools for biotechnological process. *Biomolecules* **4**: 117-139.
- Souza PM, Magalhaes PO. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – A review. *Braz. J. Microbiol.* **41**: 850-861.
- Lowe ME. 2002. The triglyceride lipases of the pancreas. *J. Lipid Res.* **43**: 2007-2016.
- Yee LN, Akoh CC, Phillips RS. 1995. Terpene ester synthesis by lipase catalyzed transesterification. *Biotechnol. Lett.* **17**: 67-70.
- Patel RN. 2013. Biocatalytic synthesis of chiral alcohols and amino acids for development of pharmaceuticals. *Biomolecules* **3**: 741-777.
- Elmi F, Lee HT, Huang JY, Hsieh YC, Wang YL, Chen YJ, et al. 2005. Stereoselective esterase from *Pseudomonas putida* IFO12996 reveals alpha/beta hydrolase folds for D-beta-acetylthioisobutyric acid synthesis. *J. Bacteriol.* **187**: 8470-8476.
- Ghati A, Paul G. 2015. Purification and characterization of a thermo-halophilic, alkali-stable and extremely benzene tolerant esterase from a thermo-halo tolerant *Bacillus cereus* strain AGP-03, isolated from 'Bakreshwar' hot spring, India. *Process Biochem.* **50**: 771-781.
- Kaiser P, Raina C, Parshad R, Johri S, Verma V, Andrabi KI, et al. 2006. A novel esterase form *Bacillus subtilis* (RRL 1789) : purification and characterization of the enzyme. *Protein. Expr. Purif.* **45**: 262-268.
- Kim HK, Na HS, Park MS, Oh TK, Lee TS. 2004. Occurrence of ofloxacin ester-hydrolyzing esterase from *Bacillus niacin* EM001. *J. Mol. Caltal B: Enzym.* **27**: 237-241.
- Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, et al. 2015. Production of biopharmaceuticals in *E. coli* : Current scenario and future perspective. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 953-962.
- Djokic L, Spasic J, Jeremic S, Vasilievic B, Prodanovic O, Prodanovic R, et al. 2015. Immobilization of *Escherichia coli* cells expressing 4-oxalocrotonate tautomerase for improved biotransformation of  $\beta$ -nitrostyrene. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**: 2389-2395.
- Zajkoska P, Rebroš M, Rosenberg M. 2013. Biocatalysis with immobilized *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 1441-1455.
- Shiloach J, Fass R. 2005. Growing *E. coli* to high cell density – a historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.* **23**: 345-357.
- Nakagawa S, Oda H, Anazawa H. 1995. High cell density cultivation and high recombinant protein production of *Escherichia coli* strain expressing uricase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 2263-2267.
- Lee SY. 1996. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **14**: 98-105.
- Luli GW, Strohl WR. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1004-1011.
- Castan A, Enfors SO. 2000. Characteristics of DO controlled fed batch culture of *Escherichia coli*. *Bioprocess Eng.* **22**: 509-515.
- Yazdani SS, Shakri AR, Chitnis CE. 2004. A high cell density fermentation strategy to produce recombinant malarial antigen in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1891-1895.
- Kovarova-Kovar K, Egli T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells : From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 646-666.
- Belo I, Mota M. 1998. Batch and fed batch cultures of *E. coli* TB1 at different oxygen transfer rate. *Bioprocess Eng.* **18**: 451-455.
- Liu YC, Chang WM, Lee CY. 1999. Effect of oxygen enrichment aeration on penicillin G acylase production in high cell density culture of recombinant *E. coli*. *Bioprocess Eng.* **21**: 227-230.
- Ukkonen K, Veijola J, Vasala A, Neubauer P. 2013. Effect of culture medium, host strain and oxygen transfer on recombinant Fab antibody fragment yield and leakage to medium in shaken *E. coli* cultures. *Microb. Cell Fact.* **12**: 73.
- Eiteman MA, Altman E. 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.* **24**: 530-536.
- Suarez DC, Kilikian BV. 2000. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **35**: 1051-1055.
- Kweon DH, Han NS, Park KM, Seo JH. 2001. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **36**: 537-542.
- Kilikian BV, Suarez ID, Liria CW, Gombert AK. 2000. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochem.* **35**: 1019-1025.
- Yildir C, Onsan ZI, Kirdar B. 1998. Optimization of starting time and period of induction and inducer concentration in the production of the restriction enzyme *EcoRI* from recombinant *Escherichia coli* 294. *Turk J. Chem.* **22**: 221-226.