재조합 대장균에 의한 유청으로부터 Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) 합성

김범수, 이상엽[1]
충북대학교 화학공학과, 한국과학기술원 화학공학과[1]
전화 (043)261-2372, FAX (043)269-2370

Abstract

Two recombinant *Escherichia coli* strains, GCSC6576 harboring a plasmid pSYL107 containing the *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis genes and a *fadR atoC* mutant LS5218 harboring a plasmid pJC4 containing the *Alcaligenes latus* PHA biosynthesis genes were compared for their ability to synthesize poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] from whey as the sole carbon source. With the pH-stat fed-batch culture of *E. coli* LS5218, we obtained a cell concentration, a P(3HB-co-3HV) concentration, a P(3HB-co-3HV) content, and a 3HV fraction of 31.8 g/L, 10.6 g/L, 33.4 wt%, and 6.26 mol%, respectively at 39 h.

서론

유청은 치즈산업을 비롯한 낙농업 및 유제품 산업에서 양산되는 부산물로 미국에서 생산되는 유청 중 절반만이 제품으로 이용되고 나머지는 오염물질로 분류되어 상당한 비용을 들여 처리해야 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 유청으로부터의 PHA 생산은 유청폐기물을 처리할 뿐만 아니라 부가가치가 높은 생분해성 고분자를 생산하는 잇점이 있다. 저자 등은 최근 유청을 기질로 poly(3-hydroxybutyrate) [(P3HB)]를 생산할 수 있는 재조합 대장균을 이용하여 유가식 발효도중 배양액을 제거하지 않고 균체내 P(3HB) 함량을 70-80% 얻을 수 있는 조업조건을 구하고, 발효조의 교반속도 (산소전달속도)를 제한함으로써 재조합 대장균의 PHB 생합성 시기를 조절할 수 있는 방법을 개발하였다.[1)] 본 연구에서는 P(3HB)보다 유연하고 강해서 pilot 규모로 생산되어 온 P(3HB-co-3HV)를 유청으로부터 합성하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

E. coli GCSC6576은 *R. eutropha* PHA 생합성 오페론과 *E. coli* ftsZ 유전자를 포함하는 플라스미드 pSYL107을 함유하고 있다. *E. coli* LS5218은 지방산 이용 효소

가 발현되는 *fadR atoC* 돌연변이주이며, *A. latus* PHA 생합성 유전자를 포함하는 플라스미드 pJC4를 함유하고 있다.

배양

플라스크 배양은 250 ml 플라스크 50 ml 배지에서, 유가식 배양은 2.5 L 발효조 (한국발효기)를 이용, 초기배양액 부피 0.8 L에서 수행하였다. 플라스크 배양 및 유가식 배양의 초기배지 조성, 배양조건, 분석방법 등은 이전의 논문[1]에 명시된 방법과 동일하다. 유가식 배양의 기질공급방법은 2단계 기질공급전략을 시도하였다. 배양액의 기질이 모두 소모되어 pH가 올라가면 첫 번째 단계에서는 유청과 propionic acid를 함께 공급하여 유당농도 20 g/L, propionic acid 농도 20 mM이 되도록 하였고, 두 번째 단계에서는 propionic acid 만을 pH 제어용 산으로 연결하여 공급되도록 하였다.

결과 및 고찰

재조합 대장균 GCSC6576(pSYL107)을 유청과 propionic acid를 포함하는 초기배지에서 플라스크 배양을 수행하였다. Propionic acid 농도가 증가할수록 비성장속도 및 최종균체농도가 감소하였다 (Table 1). Acetic acid induction을 하지 않은 경우의 공중합체내 최종 3HV 함량은 미량에 머물렀으며, 69.4%의 공중합체를 포함하는 균체농도 3.18 g/L를 얻었다. 10 mM의 acetic acid로 induction시킨 경우, 3HV 함량은 2.6 mol%, 균체농도 4.08 g/L를 얻었다 (균체내 P(3HB-co-3HV) 함량 52.5%). Acetic acid induction과 oleic acid 첨가시 3HV 함량은 3.03 mol%, 균체농도 3.8 g/L였다 (균체내 P(3HB-co-3HV) 함량 62.4%). 새롭게 개발된 재조합 대장균 LS5218(pJC4)를 이용하여 acetic acid induction 없이도 7.18 mol%의 3HV를 포함하는 공중합체와 3.7 g/L의 균체를 합성할 수 있었다 (균체내 P(3HB-co-3HV) 함량 37.1%) (Table 2).

보다 높은 농도의 공중합체를 얻기 위해 재조합 대장균 LS5218(pJC4)의 유가식 배양을 시도하였다. 2단계 기질공급배양 결과, 39시간에 균체농도 31.8 g/L와 3HV 함량 6.26 mol%를 포함하는 공중합체를 합성할 수 있었다 (균체내 P(3HB-co-3HV) 함량 33.4%) (Fig. 1).

요약

*R. eutropha*의 PHA 생합성 유전자를 포함하는 플라스미드 pSYL107을 가진 재조합 대장균 GCSC6576과 *A. latus* PHA 생합성 유전자를 포함하는 플라스미드 pJC4를 가진 *fadR atoC* 돌연변이주 재조합 대장균 LS5218의 유청으로부터 P(3HB-co-3HV) 합성을 비교하였다. 재조합 대장균 LS5218의 pH-stat 유가식 배

양결과, 39시간에 균체농도 31.8 g/L, P(3HB-co-3HV) 농도 10.6 g/L, P(3HB-co-3HV) 함량 33.4 wt%, 3HV 함량 6.26 mol%를 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Kim BS, O'Neill BK, Lee SY, "Increased poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli* from whey by agitation speed control" (2000), J. Microbiol. Biotechnol., 10, 628.

감사

본 연구는 과학기술부 및 한국과학재단 목적기초연구 (2001-1-30700-004-3) 지원으로 수행되었음.

Table 1. 재조합 대장균 GCSC6576(pSYL107)의 비성장속도 및 최종균체농도 (3일 후)에 미치는 propionic acid 영향

Propionic acid 농도 (mM)	비성장속도 (1/h)	최종균체농도 (g/L)
0	0.251	6.91
10	0.197	4.49
20	0.148	2.81
40	0.0771	1.79
80	0.0289	1.00

Table 2. 유청 (유당 환산농도 20 g/L) 및 propionic acid (20 mM)로부터 제조합 대장균의 종류 및 배양방법에 따른 플라스크 배양결과 비교 (3일후)

균주 및 배양방법	균체농도 (g/L)	PHA 농도 (g/L)	PHA 함량 (%)	3HV 함량 (mol%)
GCSC6576(pSYL107) no acetic acid induction	3.18	2.21	69.4	trace amounts
GCSC6576(pSYL107) acetic acid induction (10 mM)	4.08	2.14	52.5	2.6
GCSC6576(pSYL107) acetic acid induction (10 mM) + oleic acid supplementation (1 g/L)	3.8	2.37	62.4	3.03
LS5218(pJC4) no acetic acid induction	3.7	1.37	37.1	7.18

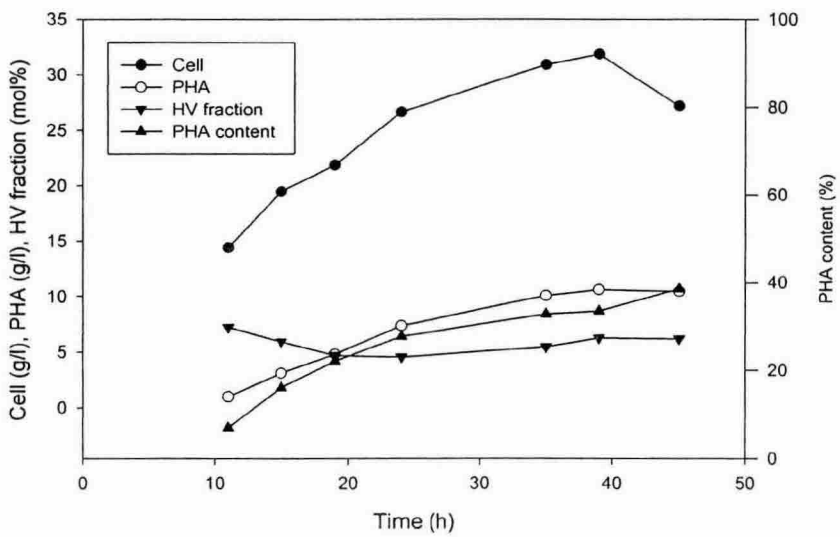

Fig. 1 재조합 대장균 LS5218(pJC4)의 유가식 배양
교반속도 500 rpm