

유전자 재조합 대장균을 이용한 5-Aminolevulinic acid(ALA)의 대량 생산 기술 및 모니터링 기술 개발

정 상 윤^{1,3}, 이 종 일^{2,3}, Th. Scheper⁴

전남대학교, 물질·생물화학공학과¹, 응용화학공학부², 생물공정기술연구소³.

University of Hanover, Institute for Technical Chemistry⁴

전화 (062)530-0847, FAX (062)530-1847

초 록

ALA is an essential intermediate in the tetrapyrrole biosynthesis pathway and has applications as a biodegradable herbicide and insecticide as well as medical applications including photodynamic therapy of cancers. For the development of mass production process of ALA it is necessary to on-line monitor some metabolites such as glycine, succinate, LA and ALA. In this work, medium compositions, pH conditions, induction and addition of LA were investigated to increase the production of ALA by recombinant *E. coli*. A 2-dimensional fluorescence sensor was used to monitor the process and the fluorescence spectra were correlated with on- and off-line data like ALAS, ALAD, cell mass etc.

서 론

5-aminolevulinic acid(ALA)은 tetrapyrrole 생합성(e.g., porphyrin, heme and vitamin B12)에서 발견되는 중간물질로 생분해성 제초제나 살충제로 사용될 뿐 아니라 환경 친화적 식물 성장 촉진제나 광역학적 암치료제로도 주목받고 있다(1). 그러나 ALA의 화학적 합성은 매우 복잡하고 수율이 낮기 때문에 광합성 조류나 박테리아 등을 이용한 생합성 시도가 활발하게 이루어지고 있다(2). 최근에는 유전자 재조합 기술을 이용하여 *Hem A* 유전자를 플라스미드에 클로닝한 재조합 대장균을 사용하여 ALA를 생산하려는 연구가 이루어지고 있다(3, 4). 한편 ALA의 대량 생산을 위해서는 생물반응기내의 미생물의 성장이나 대사공정을 온라인 모니터링하는 것이 중요하다. 특히, ALA의 전구체로 사용되는 glycine과 succinate 농도나 ALA의 생합성 효소인 ALAS와 분해효소인 ALAD의 활성 그리고 ALAD의 경쟁적 저해제로 사용되는 levulinic acid(LA) 농도 및 ALA 농도 등을 모니터링하는 것은 ALA 생산공정을 최적화하는데

필수적이다. 따라서 본 연구에서는 *egfp*(enhanced green fluorescence protein) 유전자를 *Hem A* 유전자와 융합한 플라스미드 pFLS45를 도입한 재조합 대장균을 이용하였다. 생물반응기를 이용한 ALA의 대량 생산 기술 개발을 위해 배지조성, pH, 배양온도, 유도발현 및 LA 첨가에 따른 영향을 살펴보았다. 또한 2차원 형광센서를 이용하여 각종 형광 영역에서 형광 특성 변화를 온라인 모니터링 하였고 이를 각종 온라인 및 오프라인 데이터와 비교 분석하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서는 ALA의 생산을 위해 *Bradyrhizobium japonicum*에서 분리한 *Hem A* 유전자를 pET-28b(+)에 삽입하여 pET28b/ALAS를 제조하였고, ALA의 생산특성을 2차원 형광센서로 모니터링하기 위해 *egfp* 유전자를 *Hem A* 유전자와 융합하여 재조합 플라스미드 pFLS45를 제조하였다. 제조된 재조합 플라스미드 pFLS45는 *E. coli* BL21(DE3) pLysS에 삽입하여 사용하였다. 균주의 활성화 및 전배양에는 ampicillin 50 µg/mL이 포함된 LB 배지가 사용되었으며 본배양에는 LB 배지나 MS8 배지를 사용하였다(5).

배양 방법

균주는 본배양 실험 하루전 ampicillin을 포함한 LB agar plate에 도말하여 사용하였다. Plate에서 얻은 colony를 진탕배양기에서 37 °C, 180 rpm으로 12 시간 활성화시킨 후 1%를 전배양배지에 접종하였다. 생물반응기내 본배양배지(working vol. 1L)에는 전배양액의 1%를 접종하였다. 생물반응기의 운전 조건은 37 °C 또는 30 °C, 400 rpm 및 통기량 1 vvm으로 하였으며, pH 조절에는 3N의 NaOH와 HCl을 사용하였다. 배양 배지에 따른 ALA 생산량을 조사하기 위해 본배양배지로써 최소 배지인 MS8 배지에 ALA의 전구체로 사용되는 glycine과 succinate를 첨가한 배지와 복합 배지인 LB 배지 또는 glycine과 succinate를 첨가한 LB 배지를 비교하였다. 그리고 배양 pH에 따른 ALA의 생산성 비교를 위해 pH 5, 6, 7 및 pH를 조절하지 않은 조건으로 각각 실험하였다. 또한 IPTG의 첨가나 LA 첨가에 따른 ALA의 생산성 변화를 조사하였다.

생물반응기 배양 및 모니터링

운전조건과 생물반응기 내의 공정변수 즉, pH (pH electrode, METTLER Co.), 용존 산소 농도 (O₂ sensor, METTLER Co.) 및 배가스(O₂/CO₂ gas analyzer, LOKAS Co.)는 모두 Labview software ver. 6.1(National instrument Co.)를 이용하여 실시간으로 온라인

모니터링 하였다. 또한, 생물반응기 내의 형광특성 변화를 온라인 모니터링하기 위해 2차원 형광분광광도계(Model F-4500, Hitachi Co.)를 사용하였다. 또한 스테인리스 생물반응기(KoBiotech Co., 2.5 L) 측면에는 액체 광학 전도관(liquid light conductor, Lumatek, Germany)을 직접 연결할수 있는 석영창을 설치하였다.

분석 방법

상등액내 포도당 농도분석에는 GOD/POD와 ABTS_{red}를 이용한 비색법을 이용하였다. 세포농도의 측정은 1~20배 희석한 시료를 600 nm 파장에서 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하였다. 그리고 건조균체량(g/L) 측정을 위해 2 mL의 시료를 원심분리한 균체를 멸균수로 세 번 세척한 후 80°C에서 하루 동안 건조한 샘플 5 개의 평균을 이용하였고 OD₆₀₀값과 상관관계식을 구하였다. 상등액내 ALA 농도와 세포내 ALAS를 효소 활성 측정은 Mauzerall & Granick의 방법(6)을 사용하였고, ALAD의 활성은 Sato의 방법(7)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

pH에 따른 영향

최소 배지에서 조절 pH에 따른 성장특성 및 ALA 생산 특성을 조사하기 위하여 조절하지 않은 실험을 대조군으로 하고 pH를 5, 6, 7로 각각 조절하여 비교 분석하였다.

배양배지에 따른 영향

ALA의 생산성 및 온라인 형광 데이터의 비교 분석을 위해 대장균의 일반적인 배양 배지로 사용되는 LB 배지와 최소배지인 MS8을 본배양 배지로 사용하였다.

유도 발현에 따른 영향

pET system의 유도 발현물질인 IPTG를 첨가하여 유도 발현에 따른 생산성의 차이를 살펴보았으며, 유도 발현 온도에 따른 영향을 살펴보기위해 30°C에서 반복 실험하였다.

LA 첨가에 따른 영향

ALA에서 porphobilinogen(PBG) 전환을 촉매하는 ALAD의 경쟁적 저해제로 사용되는 LA를 첨가하여 ALA가 생산성 변화를 고찰하였다

요약 및 전망

본 연구에서는 유전자 재조합 대장균을 이용한 ALA의 대량 생산 기술 개발을 위해 교반형 생물반응기에서 회분 배양시 배양 배지의 영향과 pH, 온도, 유도 발현 및 LA 첨가에 따른 생산성을 고찰하였다. 그리고 공정의 모니터링과 효과적인 공정 최적화를 위하여 2차원 형광센서를 이용하여 ALA 생산 공정을 모니터링하고 이를 각종 데이터와 비교 분석하였다. 또한 ALA 생산성의 획기적인 증대를 위해 유가/연속식 공정을 개발하고자 하며, 숙신산-FIA, glycine-SIA 및 ALA/LA의 온라인 HPLC 기술을 개발 도입하고자 한다.

감사

본 연구는 2002년 과학재단 특정기초연구 (과제번호 R01-2002-000-00027-0)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌.

1. Sasikala, K., M. Watanabe, T. Tanaka and T. Tanaka, "Biosynthesis, bio technological production and applications of 5-Aminolevulinic acid" (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-29
2. Kamiyama, H., Y. Hotta, T. Tanakam, S. Nishikawa and K. Sasaki, "Production of 5-Aminolevulinic Acid" (2000), *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 215
3. Ikemi, M., K. Murakami, M. Hashimoto and Y. Murooka, "Cloning and characterization of genes involved in the biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Escherichia coli*, Gene" (1992), **121**, 127-132
4. Choi, C., B.S. Hong, H.C. Sung, H.S. Lee and J.H. Kim, "Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*"(1999), *Biotech. Lett.*, **21**, 551-554.
5. Seo, K.H., J.I. Rhee, "재조합 *Escherichia coli*에 의한 5-Aminolevulinic acid (ALA) 생산 연구" (2001), *한국생물공학회 추계발표대회*, 서울, 715-718
6. Mauzerall, D. and S. Granick, "The Occurrence and Determination of δ -Aminolevulinic acid and Porphobilinogen in Urine" (1956), *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-466.
7. Sato, K., K. Ishida, T. Kuno, A. Mizuno, and S. Shimizu, "Regulation of Vitamin B12 and Bacteriochlorophyll Biosynthesis in a Facultative Methylotroph, *Protaminbacter ruber*" (1981), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 439-447.