

유전자 조작된 *Klebsiella pneumoniae* 에 의한 L-tryptophan의 생산

김 용 태 · 정 용 섭* · 홍 석 인
고려대학교 화학공학과
*전북대학교 식품공학과

Production of L-tryptophan by Genetically Engineered *Klebsiella pneumoniae*

Yong Tae Kim, Yong Seob Jeong* and suk In Hong

Department of Chemical Engineering, Korea University

*Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

ABSTRACT

The optimum conditions for the production of tryptophan using a recombinant *Klebsiella pneumoniae* *phe A tyr A trp R/pSC 101-trp⁺* and its plasmid stability during tryptophan production were studied. The optimum temperature was 37°C and the specific growth rate was 1.05 h⁻¹ at 37°C. Tryptophan production was increased by glucose fed-batch culture, and tryptophan was accumulated to 0.175 g/l after 36 hrs. This amount was about 1.2 and 1.6 times greater than that obtained from batch culture and flask culture, respectively. The stability of the strain in fed-batch culture was greatly different from that in repeated flask culture. After 6 generation, 95% of total cells was stable in repeated flask culture, but in fed-batch culture only 50% was stable.

서 론

L-트립토판은 영양상 빠질 수 없는 필수 아미노산의 하나로서 발육, 성장, 체중유지, 체지방유지, 혈구 성분 조성, 유즙 분비 등에 중요한 역할을 하는 생명유지에 빠질 수 없는 물질이며, 의약, 영양원, 또는 동물 사료의 첨가물로서 널리 이용되고 있는 중요한 아미노산이다(1). 일반적으로 곡물류에는 L-트립토판이 부족하기 때문에 이 아미노산을 첨가함으로써 사료의 질을 증가시킬 수 있다. 이와 같이 L-트립토판의 광범위한 유용성으로 인하여, 생산 비용을 절감하기 위한 트립토판 생산 공정에 여러 연구자들의 관심이 계속되고 있다. L-트립토판 제조는

화학적 방법, 및 효소에 의한 방법, 미생물에 의한 발효 방법이 있으며, 현재 L-트립토판 제조에는 화학적 합성 공정이 주로 사용되고 있다.

화학적 방법에 의한 D,L-트립토판을 제조하는 20여 방법이 현재 까지 알려 졌으며, 장단점으로서 수율은 높은 반면, 고온 및 고압의 반응 조건으로 인한 많은 에너지가 필요하며, 생물학적으로 활성이 있는 L-형으로의 광학적 분리가 요구되며, 또한 D-트립토판의 라세미화(racemization) 반응을 필요로 한다. 그러므로 최근에는 화학적 방법의 단점을 보완하기 위하여 효소 및 미생물에 의한 방법이 꾸준히 연구 되고 있다(2~5).

효소에 의한 방법으로 L-트립토판을 생산한 연구

들로서, Nakazawa (6) 등은 *Proteu rettgeri*에서 인돌과 pyruvate를 기질로 하여 65.6%의 수율로 L-트립토판을 얻었고, Bang (7) 등은 Triton-100을 사용해서 인돌과 L-세린으로부터 93.2%의 수율로 L-트립토판을 얻었음을 발표했다. 그러나 산업적으로는 원료로 사용되고 있는 인돌, pyruvate, L-세린 등의 가격이 비싸다는 단점이 있다.

미생물에 의한 트립토판 생산은 전구체를 사용하지 않는 발효와 anthranilate, 인돌 등의 전구체를 이용하는 발효가 연구되어 왔다. 미생물에 의하여 트립토판을 생산할 때 방향족 아미노산의 생합성 경로의 제어기작은 매우 복잡하다(8-10). 그리고 방향족 아미노산의 생합성 경로는 미생물에 따라 차이가 있지만 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*는 거의 비슷한 대사경로를 갖는다. 수행된 대부분의 연구들은 트립토판의 과잉생산(overproduction)을 위해 돌연변이 변이원(mutagen)으로 처리하여 유전적인 억제가 해제된 변이주를 분리하거나, 또는 유전자 재조합에 의해 재조합 *trp* 유전자가 증폭된 형질전환체들을 선별해 내는 방법을 이용하였다.

예를들면, Aiba 등(11, 12)은 트립토판 저해에서 해제된 *trp* 오페론을 갖고 있는 재조합 *trp* 플라스미드를 이용한 균주를 사용하여 0.229 g/l-hr의 트립토판을 생산이 가능했음을 발표했으며, Tribe와 Pittard(13)는 형질도입(transduction)에 의해 트립토판 생합성 경로에 관여하는 유전자들의 변화에 의한 영향을 실험하여, 트립토판 생산을 위한 구체적인 방향을 제시해 주었다. 그리고 Sanchez와 Demain(14)은 *Hansenula polymorph*를 이용하여 메탄올로부터 소량의 트립토판을 생산해 냈으며, Shio (15, 16) 등은 anthranilate의 아미노기 공급자인 glutamine에 대한 저해를 막기 위해서 유사체인 azaserine에 저항성 있는 균을 분리해서 10.3 g/l 까지 트립토판을 생산 가능했음을 발표했다.

유전자 재조합 균주의 균체 성장에 따른 불안정성의 문제를 해결하기 위한 많은 연구가 진행되어졌다. Imanaka (17) 등은 트립토판 오페론을 지닌 재조합 플라스미드는 트립토판 synthetase 양이 증가할 때 불안정해짐을 알아냈으며, 이러한 효소의 과잉생산으로 인한 불안정성은 재조합 플라스미드가 사라졌거나 혹은 그 플라스미드 중 트립토판 오페론이 빠진 결과로 보았다. Godwin과 Slater(18)는 기초배지에 대한 플라스미드 안정성을 조사하였으며, Siegel과 Ryu(19)는 온도에 민감한 재조합 균주를 두단계 연속배양을 통해 적정 생산에 관한 연구를

하였고, Kim과 Ryu(20)는 모형화를 통해 유전자 재조합된 균주의 안정성 개선을 위한 연구를 하였다. Imanaka와 Aiba(21, 22)는 플라스미드를 함유한 균이 산업에 사용될 수 있는 가에 대한 판단을 할 수 있는 간단한 방법으로, 플라스크 배양에서 생산규모의 발효를 위한 점진적인 5단계 방법을 제안했다. Dwivedi (23) 등은 연속공정에서 재조합 변이주의 플라스미드 안정성과 생성물 생산성을 연구하여, 연속공정에서 유전자 재조합 변이주의 발효가 문제점이 있음을 지적했다.

본 연구에서는 유전자 재조합된 변이주의 트립토판 최적 생산 온도를 조사하였고, 세포배양시 문제가 되는 플라스미드 안정성의 변화를 연구하였다. 그리고 재조합 변이주에 의한 트립토판 생산을 목적으로 회분배양과 첨가회분배양의 방법으로 트립토판 생산성 및 발효 방법을 비교해 보았다.

재료 및 방법

균주

사용된 균주는 *Klebsiella pneumoniae phe A, trp A, trp R/pSc 101-trp⁺*이며, pSC 101의 copy number는 5~6개이다.

배지

트립토판 생산시 사용된 배지(MI)는 증류수 1리터에 KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 9.3g, NH₄Cl 3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, Casamino acid 1g, Glucose 30g, Na-citrate 5g, Phenylalanine 20mg, Tyrosine 20mg이 사용되었으며, 고형배지의 경우는 1.5% 한천을 첨가하여 사용하였고, 각 배지의 초기 pH는 2N NaOH로 7.0으로 조절하여 사용하였다.

분석방법

균체량(cell mass) 측정은 배양액을 0.9% saline으로 10~20배로 희석하여, Spectronic 20(Bausch & Lomb co.)로 600nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 건조균체량(dry cell weight)은 배양물 20ml을 기공 직경이 0.2μm인 micromembrane 필터(Gelman co.)를 이용하여 여과한 후 100-105℃에서 항량이 될 때까지 건조시켜 측정하였다.

포도당은 DNS방법(24)에 의해 측정했으며, 트립토판은 Udenfriend와 Peterson(25)이 제안한 방법을 이용하여 정량했다. 트립토판, 페닐알라닌, 타

이로신, 발린을 정성분석하기 위해 thin layer chromatography(TLC) 방법을 이용했다. 그리고 플라스미드 안정성을 측정하기 위해 배양액을 적절하게 희석한 후, L.B. 고형배지와 V.B. 선택고형배지를 사용하여 replica-plate 방법으로 측정했다.

배양조건

플라스크 배양을 위해 500ml 삼각플라스크에 100ml MI배지를 넣고 종균배양물 1ml을 접종하여 회전식 진동기(B. Braun co.)를 사용하여 37°C, 200rpm, 초기 pH 7의 배양조건에서 48시간 배양했다. 그리고 회분발효 및 첨가회분발효에는 교반속도, 온도, 용존산소, 거품제거, pH 등의 기록 또는 조절이 가능한 생물반응기(B. Braun co., working volume 2l)가 선정된 조건에서 운영되었다(26).

결과 및 고찰

배양온도의 영향

플라스크 배양방법을 이용하여, 배지 온도가 트립토판 생산량에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 1에 나타냈다. 배양온도를 34, 37, 40°C로 변화하여 온도의 영향을 관찰했으며, 트립토판 생산 적정온도는 37°C임을 알 수 있었다. 최저온도에서의 최대균체비 증식속도는 1.05 hr^{-1} , 트립토판 최대생산량은 91mg/l이었다.

플라스미드 안정성

일반적으로 발효산업에서 플라스크 배양으로 부터 산업 생산 규모 까지는 점진적인 5단계의 Scale-up 과정을 거치게 되며, 생산 규모 및 공정에 따라 조금

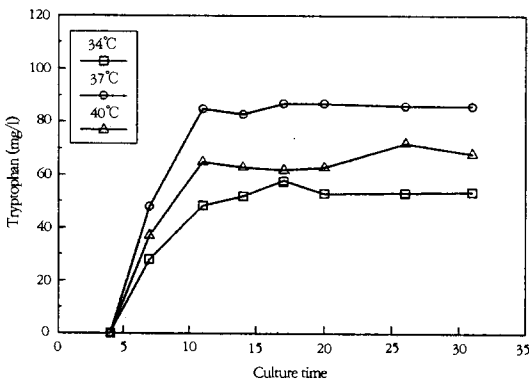


Fig. 1. Effect of temperature on tryptophan production

의 차이는 있겠지만 거의 25세대를 거치게 된다. 이러한 여러 단계를 지날 때 플라스미드 안정성의 변화는 산업화 가능성의 여부를 판단하는 대단히 중요한 요인이 된다(21,22).

Fig. 2는 각 단계를 한번의 회분식 플라스크 배양으로 연속되는 5단계를 교대로 배양하여 트립토판 생산량의 변화와 플라스미드 안정성을 나타낸 결과이다. 안정성은 5-15 세대 사이에서는 변화가 심하지 않으나 15-20 세대에서는 급격하게 떨어진다. 트립토판 생산에도 5-15세대 사이에는 변화가 심하지 않으나 15-20세대 사이에는 안정성의 경우와 같이 급격하게 떨어졌다. 반면에 균체량은 각 단계를 지나는 동안 변화가 거의 없었다. 즉, 균체량은 변화가 없으나 안정성은 급격히 떨어지고 트립토판 생산량도 감소 하였다. 이러한 점으로 보아 재조합 변이주일 경우에는 플라스미드 안정성이 트립토판 생산에 미치는 영향이 상당히 크다는 것을 알 수 있다. 연속 교대배양, 첨가회분배양 I 및 II에 대한 안정성 실험 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 연속 교대배양의 경우에는 15-20 세대에서 안정성이 급속히 떨어졌으며, 25세대에서는 27%로 감소하였다. 첨가회분배양 I, II에서의 안정성은 10세대에서 57% 및 51%이었다. 첨가 회분배양이 연속 교대 배양에 비해 안정성이 떨어짐을 알 수 있었다.

회분배양

플라스크 배양에서 얻은 배양 적정온도 37°C, pH는 7로 자동조절 된 발효조에서의 회분배양 결과를 Fig. 4, 5에 나타냈다. Fig. 4는 회분배양 I (600 rpm, 1vvm)의 결과로서 균체농도는 5.4(건조균체량=3.24 g/L)이고, 트립토판 생산은 144mg/l이었다. 또한 트립토판 생산성은 12mg/l-hr이고,

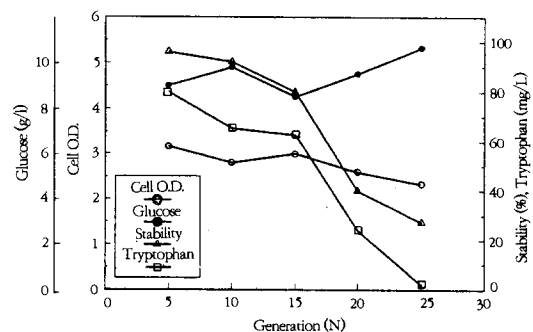


Fig. 2. Effect of repeated flask culture on the plasmid stability and tryptophan production

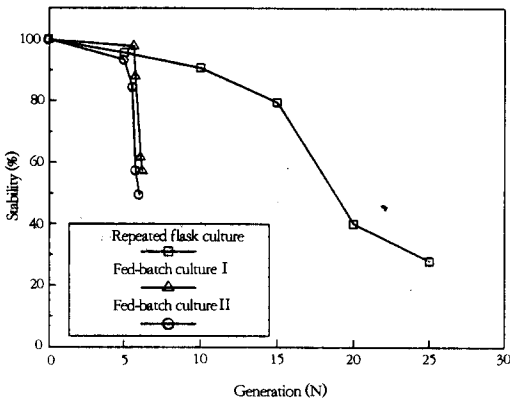


Fig. 3. Comparison of plasmid stability in various cultures

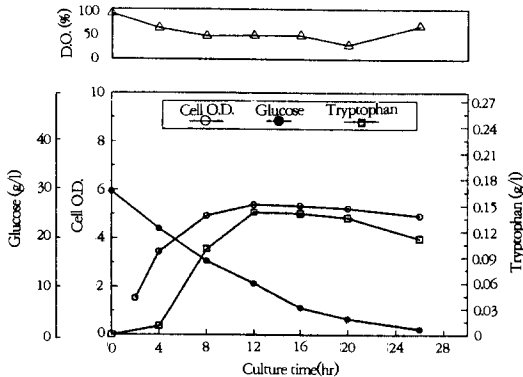


Fig. 4. Growth and production curve in batch culture I (37°C, pH 7.0, 600 rpm, and 1vvm)

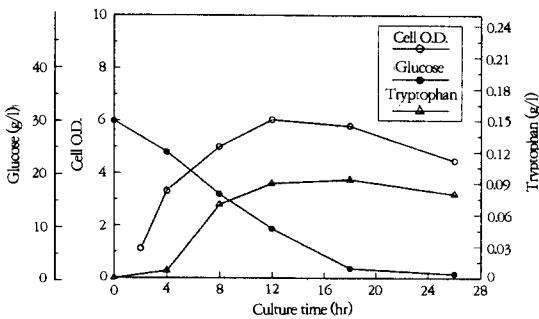


Fig. 5. Growth and production curve in batch culture II (37°C, pH 7.0, 900 rpm, and 2vvm)

균체의 생산성은 0.27 g/l-hr이었다. 상기 수치들을 같은 온도에서의 플라스크 배양의 트립토판 생산성

및 균체 생산성과 비교한 결과 각각 2.2배 및 1.4배 증가한 것이다. 이러한 효과는 플라스크 배양에 비해 통기(aeration) 효과가 좋고, 특히 pH가 일정하게 유지된 결과로 보여진다. 또한 트립토판 생산은 균체량과 다르게 약간 지연되다가 8시간 후에 큰 변화로 증가하여 12시간 후에 최대 생산성을 보였다. 용존산소량은(dissolved oxygen, D.O.) 균체량이 증가함에 따라 50%에서 일정하게 유지되고 균체가 정지기에 들어감에 따라 용존산소량이 다시 증가하여 75%에 이른다. 트립토판 생산이 16시간 이후에 감소하는 이유중의 하나는 연속교대배양에서 논의한 플라스미드 안정성에 기인하는 것으로 사료된다. 그리고 기질로 사용된 포도당은 26시간이 되면 거의 고갈되기 때문에 장시간 발효를 위한 방법으로서 첨가회분배양이 적절하리라 생각된다. 회분배양 I의 경우가 Fig. 5에 나타난 회분배양 II(900 rpm, 2vvm)의 경우에 비해서 트립토판의 최대 생산량이 50% 증가했다. 또한 회분배양 II의 경우에 균체 흡광도가 12시간 배양후 회분배양 I에 비해 증가했으나, 생산성은 약간 감소했다. 이러한 원인은 용존산소량이 많아짐에 따라 균체량은 증가하지만 플라스미드가 없는 균의 증식속도가 플라스미드있는 균의 증식속도 보다 크기 때문에 균체량의 다수가 플라스미드가 없는 균들로 이루어져 트립토판의 생산량이 감소하였다고 판단된다.

첨가회분배양

트립토판 생산량을 증가시키기 위하여 기질인 포도당이 거의 고갈되는 22시간 경과 후에 새로운 포도당을 첨가하는 간헐 첨가회분배양 I (intermittent feeding fed-batch I : 600 rpm, 1vvm) 및 통기와 교반에 변화를 주어 간헐 첨가회분배양 II(800 rpm, 2vvm)의 결과들을 각각 Fig. 6, 7에 나타냈다. 간헐 첨가회분배양 I의 경우 배양 II에 비하여 트립토판 생산량이 35% 증가하였고, 균체흡광도는 11% 감소하였다. 이와같은 결과는 앞서 기술한 회분배양 I과 II의 경우와 마찬가지로 교반속도와 통기속도가 증가하면 균체흡광도는 증가하고 반면 트립토판 생산량은 감소하는 공통적인 결과를 얻었다. 간헐 첨가회분배양과는 달리 기질인 포도당을 발효 시작부터 계속 첨가하면서 배양하여, 연속 첨가회분배양(continuous feeding fed-batch), 결과를 Fig. 8에 나타냈다. 최대 흡광도는 4.9이었고, 최대 트립토판 생산량은 90 mg/l이었다. 간헐 첨가회분배양 I에 비하여 균체흡광도 및 트립토판 생산량

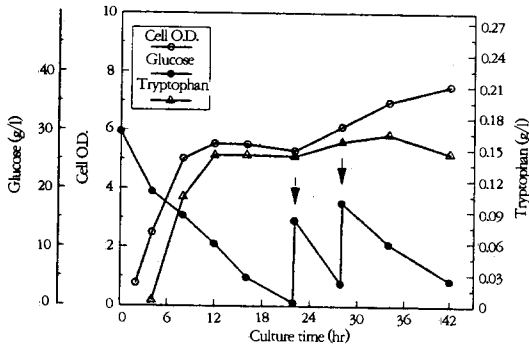


Fig. 6. Growth and production curve in glucose intermittent feeding fed-batch culture I (↓ : glucose feeding 200g/l, 100ml culture conditions : the same as batch I)

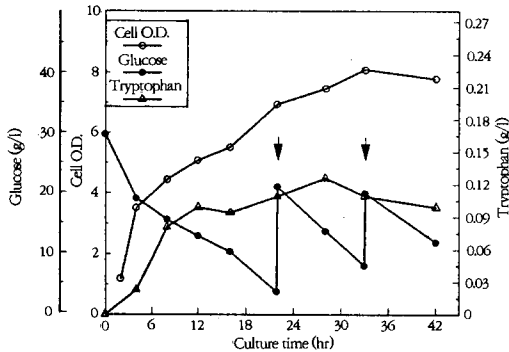


Fig. 7. Growth and production curve in glucose intermittent feeding fed-batch culture II (↓ : glucose feeding 200g/l, 100ml culture conditions : 800 rpm, 2vvm)

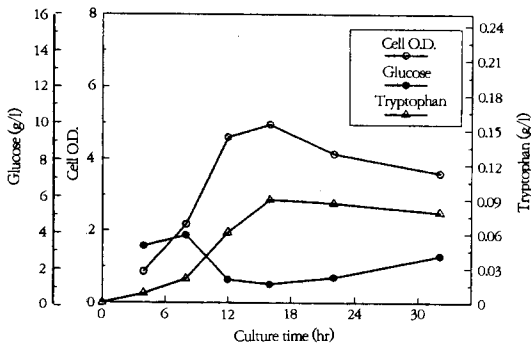


Fig. 8. Growth and production curve in glucose continuous feeding fed-batch culture (reservoir glucose conc. : 187.5 g/l, feeding rate : 10ml/hr, 37°C, 600 rpm, and 1 vvm)

이 각기 35% 및 45% 감소한 값이다. 회분배양 I 과 첨가회분배양 I 을 비교한 결과 첨가회분배양의 트립토판 생산량이 회분배양에 비해 15% 증가하였고, 첨가회분배양의 최대 트립토판 생산량은 165 mg/l 이었으며, 최대 균체흡광도는 7.5(건조균체량 = 5g/l)이었다. 결과적으로 본 실험에서 시도된 배양방법 중에서 간헐 첨가회분배양이 트립토판 생산에 적절하였으며, 유전자 재조합 변이주를 이용한 연속공정 발효시 문제가 되는 플라스미드 안정성을 증대시킬 수 있는 균체 고정화 방법 및 생물 반응기 개선을 통한 지속적인 연구에 의해 트립토판 생산성을 증대 할 수 있으리라 예견된다.

요 약

유전자 조작된 *Klebsiella pneumonia*를 이용하여 트립토판 생산을 위한 최적 조건 및 플라스미드 안정성에 대한 연구를 수행했으며, 최적온도는 37°C, 최적온도에서의 비증식속도는 1.05h⁻¹로 측정되었다. 포도당을 기질로 사용하여 첨가회분배양 36시간 후의 트립토판 농도는 0.175g/l 이었으며, 이 결과는 다른 회분배양이나 플라스크 배양에 비해 1.2 및 1.6배 증가한 수치이다. 첨가회분배양에서의 균주 안정성은 플라스크에서의 연속 교대 배양에 비해 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다. 6세대 후에 플라스미드 안정성을 비교한 결과, 연속 교대 배양에서는 95%가 유지되었으나 첨가 회분배양에서는 50% 만 이 유지됨을 측정했다.

감사의 글

본 연구에 사용된 균주를 제공하여 주신 고려대학교 농화학과 이 세영 교수께 감사드립니다.

참고문헌

- Soda, K., Tanaka, H., and Esaki, N. : Biotechnology, Vol. 3, 479(1983).
- Keneko, T., Izumil, Y., Chibata, I., and Itoh, T. : "Synthetic Production and Utilization of Amino Acids", Kodansha Ltd., Japan, 243 (1974).
- Greenstein, J. P. and Winitz, M. : "Chemistry of the Amino Acids", John Wiley & Sons Inc., New York, Vol. 3, 2316(1961).

4. Terui, G. : "The Microbial Production of Amino Acids", Kodansha Ltd., 515(1972).
5. Lee, I., Ahn, K., Kim, I., and Lee, S., : Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. **20**, 73(1992).
6. Nakazawa, H., Enei, H., Okumura, S., and Yamada, H. : Agri. Biol. Chem., **36**, 2523 (1972).
7. Bang, W., Lang, S., Shame, H., and Wagner, F. : Biotech. Bioeng., **25**, 999(1983).
8. Gibson, F. and Pittard, J. : Bacteriol. Rev., **32**, 465(1968).
9. Margolin, P. : "Metabolic Pathways", Vogel, H. J. ed., Vol Academic Press, New York, 3rd ed., Vol. **5**, 389(1971).
10. Umbarger, H. E. : Ann. Rev. Bioeng., **19**, 1563(1977).
11. Aiba, S., Imanaka, T., and Tsunekawa, H. : Appl. Environ. Microbiol., **43**, 289(1982).
12. Aiba, S., Imanaka, T., and Tsunekawa, H. : Biotech. Lett., **2**, 525(1980).
13. Tribe, D. E. and Pittard, J. : Appl. Environ. Microbiol., **38**, 181(1979).
14. Sanchez, S. and Demain, A. L. : Appl. Environ. Microbiol., **35**, 459(1978).
15. Shiio, I., Sugimoto, S., and Nakagawa, M. : Agri. Biol. Chem., **39**, 627(1975).
16. Shiio, I., Sugimoto, S., and Nakagawa, M. : Agri. Biol. Chem., **46**, 1849(1982).
17. Imanaka, T., Tsunekawa, H., and Aiba, S. : J. Gen. Microbiol., **118**, 253(1980).
18. Godwin, D. and Slater, J. H. : Gen. Microbiol., **3**, 201(1979).
19. Siegel, R. and Ryu, D. Y. : Biotech. Bioeng., **27**, 28(1985).
20. Kim, D. F. and Ruy, D. Y. : Biotech. Bioeng., **26**, 497(1984).
21. Imanaka, T. : Annual Report of ICME, **2**, 103 (1979).
22. Imanaka, T. and Aiba, S. : Annual N. Y. Acad. Sci., **1**, 369(1980).
23. Dwivedi, C. P., Imanaka, T., and Aiba, S. : Biotech. Bioeng., **24**, 1465(1982).
24. Miler, G. L. : Anal. Chem., **31**, 426(1959).
25. Udenfriend, S. and Peterson, R. E. : Methods in Enzymology, Vol. **3**, 613(1962).
26. Kim, Y., : M. S. Thesis, Korea Univ., Seoul, Korea(1986).