

## 초산 생성 및 비성장속도가 재조합 대장균 유가식 발효의 생산성에 미치는 영향

구 태 영 · †박 태 현  
성균관대학교 유전공학과

### Effect of Acetic Acid Formation and Specific Growth Rate on Productivity of Recombinant *Escherichia coli* Fed-Batch Fermentation

Tae-Young Koo and Tai-Hyun Park †

Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University,  
300 Chunchun-Dong, Suwon 440-746, Korea

#### ABSTRACT

Specific growth rate was controlled for the repression of acetic acid formation in the fed-batch fermentation of recombinant *Escherichia coli*. With controlled specific growth rate, we studied the effect of the specific growth rate on cell growth, glucose consumption, acetic acid formation, and the expression of recombinant protein ( $\beta$ -lactamase). High specific growth rate caused the accumulation of glucose and acetic acid, and lowered the production of recombinant protein. However, the addition of methionine recovered the gene expression by alleviating the negative effect of acetic acid at high specific growth rate.

#### 서 론

유전자 재조합 기술의 발달에 의해 많은 종류의 재조합 단백질이 산업적 규모로 생산되고 있다. 이러한 재조합 단백질 생산에 사용되어지는 숙주 세포로는 대장균과 효모가 많이 이용되고 있으며, 특히 대장균은 여러가지 장점으로 인하여 가장 먼저 산업적 생산에 널리 이용되어져 왔다. 그러나 대장균의 생장은 배양중 분비 축적되는 초산, 에탄올 등에 의해 저해를 받으며, 특히 호기성 조건에서는 초산이 세포 성장 및 유전자 재조합 단백질의 생산성을 저해하는 주된 원인으로 보고되었다(1).

대장균의 호기적 배양시 배지내의 포도당은 pyruvate, acetyl-CoA, TCA cycle을 거치는 대사 과정을 통해 생장에 필요한 ATP와 NAD(P)H가 생산된다. 이때 대장균이 포도당을 섭취하여 이용하는 위의 대사 과정에는 한계가 있다. 만약 배지 내에 과다한 양의 포도당이 존재하면 여분의 포도당을 이용해 acetyl-CoA로부터 초산이 생성되는 과정이 유도된다. 초산 생성 과정에서 1/2분자의 포도당 당 한 분자의 ATP가 생성되며, 축적된 초산은 이후 배지 내 포도당 고갈시 대장균에 의해 탄소원으로 섭취된다. 그런데 대장균의 배양 중 초산이 지속적으로 생산되어 배지내에 축적되면 세포 성장과 유전자 재조

† Corresponding Author

합 산물 생산에 저해 작용을 미치게 된다(2).

대장균을 이용한 유전자 재조합 단백질 생산시 생산성을 증가시키기 위해서는, 배양 중 초산의 생성을 억제하거나 이미 축적된 초산에 의한 저해 작용을 경감시켜줄 수 있는 배양 공정의 개발이 요구된다. 대장균 배양시 초산의 생성을 억제하는 방법으로는 세포 비성장 속도를 낮게 조절하거나(3) fructose를 탄소원으로 공급하는 방법(4), 또는 corn-steep liquor등을 공급하여 glucose 섭취속도를 감소시켜 주는 방법(5) 등이 있다. 이미 축적된 초산에 의한 저해 효과를 경감시켜 주는 방법으로는 yeast extract나 아미노산을 첨가해 주는 방법(6, 7, 8)과, 투석을 이용해 배지내의 초산을 직접 제거하는 방법(9, 10) 등이 보고되었다.

재조합 대장균 발효를 위해 유가식 배양 방법이 널리 이용되어 왔고, 유가식 배양시 가장 중요한 문제는 배지공급 속도를 결정하는 것으로서 이를 위해 다양한 방법들이 제시되어져왔다. 본 연구에서는 세포 비성장속도가 조절되는 유가식 배양에 있어서, 비성장속도가 초산생성 및 그에 따른 재조합 단백질 생산에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 플라스미드

본 실험에서 사용된 재조합 대장균주는 *E. coli* JIL1715로 성균관대학교 생물학과 미생물학연구실에서 제공되었다. 이 균주는 wild type K12와 거의 동일한 유전적 구조를 갖는 MG1655에서 대장균 염색체내의 *lacZ* 유전자를 제거하고 플라스미드 pMKT2-1을 transformation한 균주이다. 유전자 제거 과정에서 *lacZ* 유전자 바로 뒤의 proline 합성 유전자가 함께 제거되어 배양시 100 mg/ℓ의 proline을 배지에 첨가하였다. 사용된 플라스미드 내에는 선별인자로서 ampicillin 내성 유전자를 갖고 있다.

### 사용 배지

종균배양 및 회분배양에서는 M56 최소배지에 yeast extract(1g/ℓ), L-proline(100mg/ℓ)이 첨가된 배지가 사용되었고 M56 최소배지의 조성은 Table 1과 같다. 유가식 배양에 사용된 배지는 이전에 발표된 논문상의 배지 조성(11)을 참조하여 M56 최소배지를 기초로 제조하였으며 그 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of culture medium.

1. M56 minimal medium(g/ℓ)	
Glucose	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	22.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0005
2. Feeding medium in fed-batch fermentation(g/ℓ)	
Glucose	200
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.316
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0375
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0065
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0375
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0099
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0065
L-proline	5

### 배양 방법

배양을 위한 발효조는 7L 용량의 발효조(KF-7L, Korea Fermentor Co., LTD.)를 사용하였다. 종균 배양에서는 100ml의 배지에 100mg/ℓ의 ampicillin을 첨가하여 flask 배양을 하였다. 회분배양시 조업부피는 2ℓ였으며, 유가식 배양시 2ℓ의 배지를 외부에서 첨가하여 4ℓ까지 배양하였다. pH는 5N-NaOH를 공급하여 7.0으로 유지하였으며, 공기 공급은 교반 속도를 높여주는 방법과 순수 산소를 공급하는 방법으로 배지내 용존 산소량이 최대 용존량의 20% 이상으로 유지되도록 하였다.

유가식 배양시 세포 비성장속도를 원하는 값으로 제어하기 위하여 다음 식에 의하여 배지를 지속적으로 공급하였다.

$$F = \frac{\mu X_0 V_0}{Y_{X/S} S_0} e^{\mu t}$$

여기서 F는 배지 공급속도(L/hr),  $\mu$ 는 세포 비성장속도(1/hr),  $X_0$ 는 초기 세포농도(g/ℓ),  $V_0$ 는 초기 배지부피(L),  $S_0$ 는 공급 배지내의 포도당 농도(g/ℓ),  $Y_{X/S}$ 는 세포 성장수율(g 세포/g 포도당)을 표시한다. 컴퓨터에서 계산된 F값은 D/A converter에 의해 아날로그 신호로 변환되어 배지 공급

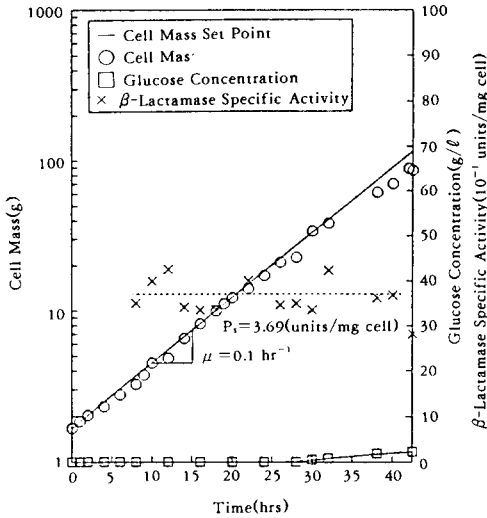


Fig. 1. Fed-batch fermentation of *E. coli* JIL1715 at  $\mu = 0.1 \text{ hr}^{-1}$

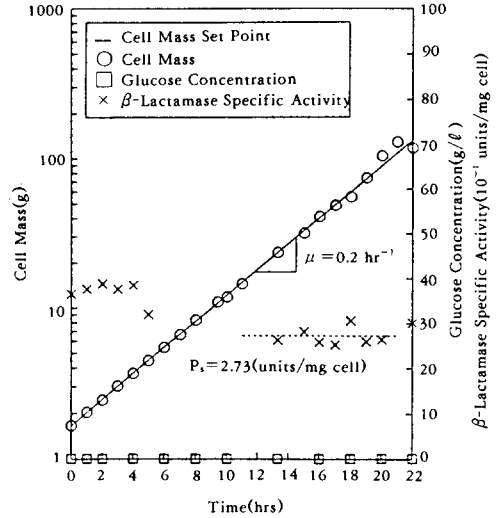


Fig. 2. Fed-batch fermentation of *E. coli* JIL1715 at  $\mu = 0.2 \text{ hr}^{-1}$

용 펌프를 작동시킨다.

분석 방법

배지내 포도당 농도는 Sigma Diagnostic Kit-Glucose(Procedure No. 510, Sigma)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 배지내 초산 농도는 HPLC로 측정하였으며(12, 13), 사용된 column은 cation-exchange column(Aminex HPX87-H 300×7.8mm, BioRad)이었고, 이동상으로는 0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(pH 1-3)를 0.4ml/min의 유속으로 흘려주었다. 1회 분석에 주입된 시료량은 100 μℓ였고, column의 온도는 상온이었으며, UV 210nm에서 흡광도를 측정하였다. 유전자 재조합 산물로는 대장균내 플라스미드의 ampicillin 내성 유전자에서 지속적으로 생성되는 단백질인 β-lactamase를 iodometric assay 방법(14-16)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

세포 비성장속도가 일정한 값으로 제어되는 유기식 발효를 0.1, 0.2, 0.3, 0.45 hr<sup>-1</sup>의 세포 비성장속도에서 각각 수행하여, 세포 비성장속도에 따른 세포 성장, 포도당 소모량, 초산 생성량 및 재조합 단백질인 β-lactamase 발현을 등을 관찰하였다. *E. coli* JIL1715의 유기식 배양시 측정된 세포 성장

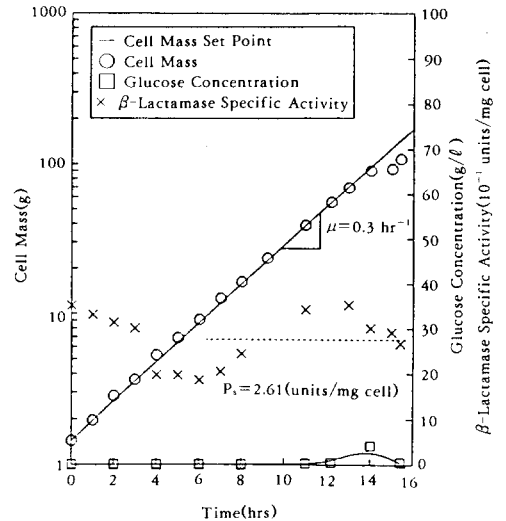


Fig. 3. Fed-batch fermentation of *E. coli* JIL1715 at  $\mu = 0.3 \text{ hr}^{-1}$

수율은 0.32(g 세포/g 포도당)이었으며, 이 값은 배지공급속도의 계산시에 이용되었다.

Fig. 1-4는 각각의 세포 비성장속도에 따른 세포 성장, 포도당 소모 및 재조합 단백질인 β-lactamase의 단위 세포당 발현율을 나타내고 있다. 가로축

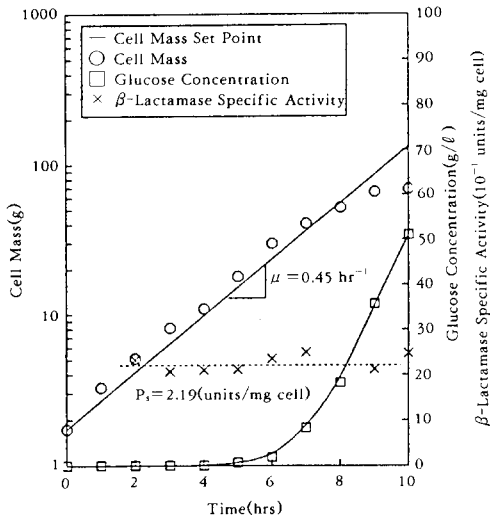


Fig. 4. Fed-batch fermentation of *E. coli* JIL1715 at  $\mu = 0.45 \text{ hr}^{-1}$

은 배지공급이 시작된 후부터의 시간을 나타내고, 원편 세로축은 세포농도( $X$ )와 조업부피( $V$ )의 곱을 로그좌표로 나타냈다. 세포 비성장속도는  $d(\ln(XV))/dt$ 로 표시되므로, 그림상의 기울기가 곧 세포 비성장속도이다. 각 경우에 있어서 직선은 원하는 값의 세포 비성장속도로 잘 제어되고 있을때의 세포 성장을 보여주는 것으로서,  $\mu = 0.1 \sim 0.3 \text{ hr}^{-1}$  경우에는 세포 질량의 실험값들이 이 직선을 잘 따라가고 있으며 배지내 포도당의 축적도 거의 일어나지 않는다. 그러나 Fig. 4( $\mu = 0.45 \text{ hr}^{-1}$ )의 경우에는 후반부에 포도당의 급격한 축적과 더불어 세포 생장이 기대값에 못미침을 알 수 있다. 재조합 단백질인  $\beta$ -lactamase의 단위 세포당 발현율은 각각의 경우에 발효 후반부에서 비교적 일정한 값으로 유지되었으며, 세포 비성장속도가 증가함에 따라 그 값은 감소하는 경향을 보여 준다.

Fig. 5는 세포 비성장속도를 0.1, 0.2, 0.3,  $0.45 \text{ hr}^{-1}$ 로 변화시키며 유가식 배양을 수행하였을 때 초산의 생성을 보여준다. 세포 비성장속도의 증가에 따른 최대 초산 생성량은 각각 0.018, 0.26, 3.0,  $3.2 \text{ g/l}$ 로 세포 비성장속도가 증가할수록 초산의 생성이 늘어남을 알 수 있다. 특히  $\mu = 0.45 \text{ hr}^{-1}$ 인 경우에는 유가식 발효 초반부터 초산의 급격한 축적을 보인다. 이상의 결과들로부터, 유가식 배양에서 세포 비성장속도가 클수록, 포도당이 축적되고 초산 생성이

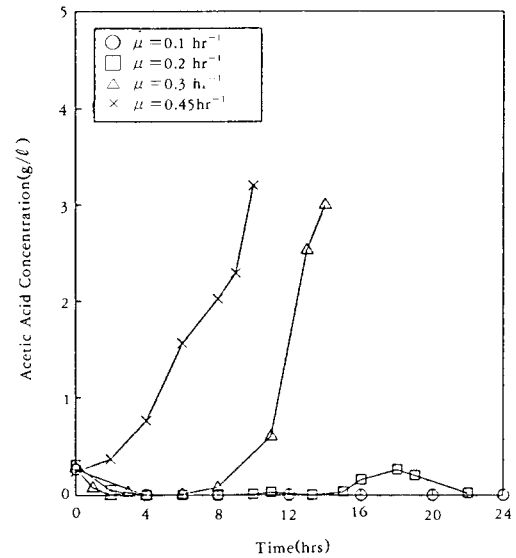


Fig. 5. Effect of specific growth rate on acetic acid formation.

늘어나며 재조합 단백질의 세포당 발현율은 떨어짐을 알 수 있다. 따라서 단위세포당 높은 발현을 얻기 위해서는 낮은 세포 비성장속도로 제어하는 것이 바람직하다. 여기서 우리는 높은 발현을 위해서 세포 비성장속도가 중요한지 혹은 초산 농도가 중요한지를 살펴볼 필요가 있다.

많은 아미노산들 중 특히 methionine은 배지내에 축적된 초산에 의한 저해 효과를 경감시켜 준다고 보고되어 있다(8). 높은 세포 비성장속도로 유가식 배양시 초산 축적이 활발히 일어나며, 재조합 단백질의 발현율이 감소하는 결과를 앞에서 보았다. 그렇다면 이러한 재조합 단백질의 단위 세포당 발현이 감소하는 것이 과연 초산 축적에 의한 저해 작용을 받기 때문인지, 만약 그렇다면 유가식 배양시에도 methionine의 첨가가 초산의 저해 효과를 경감시켜 줄 수 있는지에 대해 살펴 보았다. 이를 위해  $0.45 \text{ hr}^{-1}$ 의 높은 세포 비성장속도로 제어되는 유가식 배양에서 methionine의 농도가  $0.5 \text{ g/l}$ 의 값으로 유지되도록 첨가하며 실험하였다. 실험 결과는 Fig. 6에 보인 바와 같고, methionine은 대장균에 의해 탄소원으로 이용되지 않는다고 보고되어 있다(8). 세포 비성장속도는 원하는 값으로 잘 유지되다가 말기에 조금 떨어짐을 알 수 있다. 이는 methionine이 첨가되지 않은 Fig. 4와 비교할 때, 유사한 경향을 보이나 최종 세포 농도는  $22.5 \text{ g/l}$ 로서 높은 값을

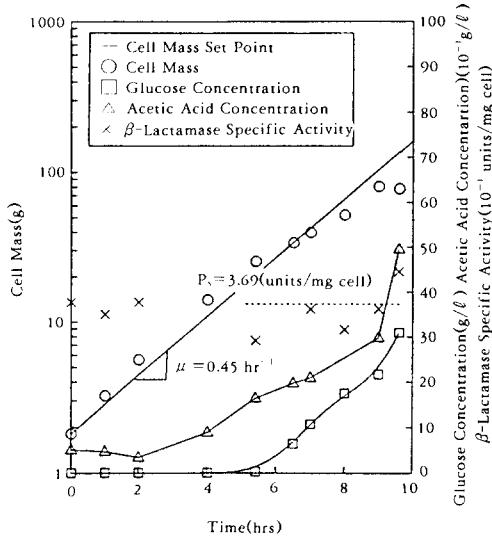


Fig. 6. Fed-batch fermentation of *E. coli* JIL1715 at  $\mu = 0.45 \text{ hr}^{-1}$  with the addition of methionine.

나타내었다. 포도당과 초산의 축적도 methionine이 첨가되지 않은 경우와 유사한 경향을 나타내었다. 공급된 포도당은 모두 소모되지 못하고 많은 양(30.9g/l)이 축적되었으며, 초산도 4.95g/l 까지 생성되었다. 여기서 주목할 만한 점은  $\beta$ -lactamase의 단위 세포당 발현율이 3.69units/mg cell로 가장 낮은 세포 비성장속도( $\mu = 0.1 \text{ hr}^{-1}$ )에서의 유가식 배양시에 보여준 값인 3.69 units/mg cell로 회복되었다는 것이다.

세포 비성장속도가 낮을수록 재조합 단백질의 발현이 증가하는 것이 세포 비성장속도의 변화에만 따른 결과인지, 아니면 세포 비성장속도 증가에 따른 초산 축적이 저해 효과를 미치는 것인지에 대해서는 논란의 여지가 있으나, 위의 결과는 높은 세포 비성장속도에서도 methionine의 첨가가 초산의 저해 작용을 경감시킴으로써 재조합 단백질의 단위 세포당 발현율이 높게 나왔음을 의미한다.

Fig. 7에서는 세포 비성장 속도에 따른  $\beta$ -lactamase의 단위 세포당 발현율을 보여준다.  $\beta$ -lactamase의 단위 세포당 발현율은 세포 비성장속도 증가에 따라 선형적으로 감소하는 경향을 나타내며, 이는 bovine somatotropin 생산에서도 유사한 결과가 보고된 바 있다(17). 이 그림은 또한 재조합 단백질 발현율에 대한 초산의 저해 효과가 methionine 첨가에 의해 경감되는 것을 보여준다. 초산의 축적 여부

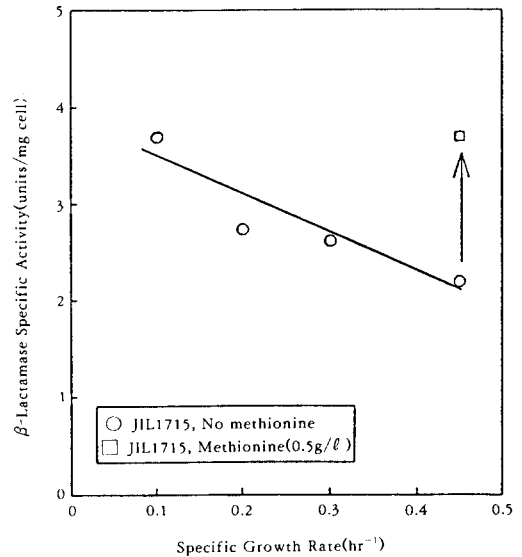


Fig. 7. Effect of specific growth rate on  $\beta$ -lactamase expression.

에 관계없이 methionine의 첨가가 재조합 단백질의 발현율을 증가시켜주지 않는가 하는 의문이 제기될 수도 있지만 methionine은 대장균 배양 중 탄소원으로 사용되지 않으며, 유가식 배양전에 수행된 회분 배양 단계에서도 같은 농도의 methionine이 첨가되어 있었지만  $\beta$ -lactamase의 단위 세포당 발현율이 methionine을 첨가하지 않은 회분 배양의 경우와 유사한 것으로 보아 위의 가능성은 배제될 수 있다.

이상의 결과를 종합해 보면, 높은 발현을 위해서는 세포 비성장속도 값보다는 초산 농도가 더욱 중요하다 할 수 있겠다. 그러나 Fig. 5에서 보는 바와 같이  $\mu = 0.2 \text{ hr}^{-1}$ 의 경우는  $\mu = 0.1 \text{ hr}^{-1}$ 에 비해 초산 생성이 얼마되지 않았는데도 발현이 상대적으로 낮은 것으로 미루어 세포외의 초산 농도 보다 세포내의 농도가 중요하게 작용할 것으로 생각된다. 세포내의 초산 농도는 측정 및 제거가 용이하지 않으므로 이를 조절할 수 있는 세포 비성장속도 또한 유전자 재조합 대장균 발효에 있어서 중요한 인자임을 배제할 수는 없을 것으로 생각된다.

### 요 약

재조합 대장균의 유가식 발효에서 초산 생성 억제를 위해 세포 비성장속도를 제어하였다. 세포 비성장속도가 일정한 값으로 제어되는 유가식 발효를 수행하여 세포 비성장속도에 따른 세포생장, 포도당

소모량, 초산 생성량 및 재조합 단백질인  $\beta$ -lactamase의 발현 등을 관찰하였다. 세포 비성장속도의 제어값이 클수록, 포도당이 축적되고 초산 생성이 늘어나며 재조합 단백질의 세포당 발현율은 떨어졌다. 그러나 높은 세포 비성장속도의 경우에도 methionine을 첨가하여 초산의 저해작용을 경감시킴으로써 단위세포당 발현율을 높은 값으로 회복시킬 수 있었다.

### 감 사

본 연구는 과학재단의 특정기초 연구과제(92-24-07)로서 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. H. P. Meyer, C. Leist and A. Fiechter(1984), *J. Biotechnol.*, **1**, 355.
2. K. Han, H. C. Lim and J. Hong(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 663.
3. J. Fiesschko and T. Ritch(1986), *Chem. Eng. Comm.*, **45**, 229.
4. W. H. Holmes(1986), *Curr. Topics Cell. Regul.*, **28**, 69.
5. S. W. Brown, H. Meyer and H. Fiechter (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 5.
6. A. Mori, H. Yoshikawa and G. Terui(1972), *J. Ferment. Technol.*, **50**, 518.
7. D. A. Schwab(1978), *Ph. D. Thesis*, Dept. of Microbiol. & Molecul. Genet., University of California, Irvine, CA.
8. K. Han, J. Hong and H. C. Lim(1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 316.
9. Y. Nomura, M. Iwahara and M. Hongo (1989), *J. Biotechnol.*, **12**, 317.
10. 김인호, 윤태호(1994), *한국생물공학회지*, **9**(5), 492.
11. S. K. Yoon, W. K. Kang and T. H. Park (1994) *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 995.
12. R. T. Marsili, H. Ostapenko, R. E. Simmons and D. E. Green(1981), *J. Food Science*, **46**, 52.
13. J. C. Diaz-Ricci, L. Regan and J. E. Bailey (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1318.
14. M. G. Sargent(1968), *J. Bacteriol.*, **95**, 1493.
15. T. Sawai, I. Takahashi and S. Yamagishi (1978), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **13**, 910.
16. C. J. Perret(1954), *Nature*, **174**, 1012.
17. S. K. Yoon, S. H. Kwon, M. G. Park, W. K. Kang and T. H. Park(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 1119.