한국생물공학회지 제 13권 제 3호
*Korean J. Biotechnol. Bioeng.*
Vol. 13, No. 3, 268-271(1998)

# 내부 필터 발효기에서 *Halobacterium halobium*의 배양에 의한 박테리오로돕신의 생산

엄 영 순 · 박 준 택 · 홍 순 호 · †이 상 엽 · 장 호 남
한국과학기술원 화학공학과, 생물공정연구센터
(접수 : 1997. 12. 24., 게재승인 : 1998. 3. 20.)

# Production of Bacteriorhodopsin by *Halobacterium halobium* in the Internal Membrane Bioreactor

**Young Soon Um, Joon Taek Park, Soon Ho Hong, Sang Yup Lee†, and Ho Nam Chang**
*Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, KAIST, Taejon 305-701, Korea*
(Received : 1997. 12. 24., Accepted : 1998. 3. 20.)

Bacteriorhodopsin in the purple membrane (PM) of halobacteria has recently been attracting much attention to be used as a component of molecular electron device and optical computers. In order to increase the productivity of bacteriorhodopsin in high cell density cultures of *Halobacterium halobium* R1, an internal membrane cell-retention bioreactor system was employed. As a result, the production of cell mass at $OD_{660}$ of 12 and of bacteriorhodopsin at 125-130 mg/L were obtained using the internal membrane bioreactor system at a dilution rate of 0.066 $hr^{-1}$. The productivity achieved by the internal membrane system (0.7 mg/L · hr) was 3.5-fold higher than that obtained by the corresponding batch cultivations (0.2 mg/L · hr).

Key Words : Bacteriorhodopsin, Halobacteria, Internal membrane, Cell retention, Fermentation

## 서 론

Bacteriorhodopsin (BR)은 사해에서 생존하는 halobacteria가 혐기 조건에서 빛을 이용해서 에너지를 얻도록 하는 막단백질이다. BR은 빛에 의한 이성질화에 의해서 변형되어 특정 파장에서 높은 흡광도를 나타내는 중간매체를 거쳐 가역적인 광변환 반응을 보인다. 이러한 특이한 광학적 성질은 전자소자의 응용에 연구되고 있는 유용한 생체 물질이다 (1-2). 따라서 BR의 수요가 증가할 것으로 예상되는 반면 이것의 생산에 대한 연구는 1960-1970년대에 주로 이루어 졌을 뿐 미비한 실정이었다 (3-5). 최근에 BR의 생산을 위한 *Halobacterium halobium* R1의 배지조성 및 발효조건에 대한 최적화 연구가 이루어져 이것을 기본 자료로 고농도 배양에 의한 BR의 대량 생산을 시도하였다 (6-7).

원시세균인 halobacteria는 성장도 느리고 고농도 배양이 힘든 것으로 알려져 있는데 (3) 세포의 성장이 정지하는 원인이 무엇인지 찾기 위해 대수증식기 말단 부분에 있는 세포배양액을 원심분리하여 상등액을 모아 그 상등액에 영양소 (yeast extract)를 넣은 배지와 넣지 않은 배지에 각각 균주를 접종하여 배양을 해 보아 영양소가 추가된 배지에서 세포가 잘 자란다면 배지에 들어가는 염의 비용을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 세포가 성장을 멈추는 원인이 substrate limitation에 의해 자라지 않는다는 것을 말하는 것이며, 세포가 잘 자라지 않는다면 세포가 생산하는 부산물에 의해 세포의 성장이 멈추는 것이라고 볼 수 있다. 이 실험을 수행한 결과 두 종류의 배지 내에서 모두 세포가 자라지 않았으며, 이로부터 byproduct inhibition에 의해 세포의 성장이 멈추는 것이라는 결론을 내리게 되었다. 이에 따라 고농도 배양을 위해 byproduct inhibition을 받는 세포의 배양에 응용되는 내부필터시스템을 적용해 보았다 (8). 내부필터를 이용한 연속발효는 반응기내에 membrane을 설치할 수 있어 장치가 간단하다는 장점이 있지만 cross flow에 의한 필터의 막힘현상이 발생하여 장시간 발효에는 어려움이 많다. 그에 비해 외부필터를 이용한 연속발효는 tangential flow에 의하여 filtering이 이루어지므로 막힘현상을 완화할 수 있지만, 반응기 외부에 필터를 장착하고 멸균하는 등 장치가 복잡하다는 단점이 있다. 본 연구에서는 균체농도가 높지 않아서 내부필터를 이용함에 있어서 막힘현상이 크게 발생하지 않으므로 희석률 (Dilution rate;D)와 산소 공급량을 변화시키면서 실험하여 균체의 성장과 BR의 생산을 증가시켜 보았으며 기존의 회분식 발효에 의한 결과와 비교하였다 (3).

† Corresponding author : Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701 Korea
Tel : 042-869-3930. Fax : 042-869-3910
E-mail : leesy@sorak.kaist.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

사용한 균주는 *Halobacterium halobium* R1 (ATCC 29341)이었고, American Type Culture Collection으로부터 분양받아 사용하였으며, 보관은 250 mL 삼각플라스크에서 복합배지 (1 L당 NaCl 250 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 20 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 g, KCl 2 g, Bacto-yeast extract 10 g) 50 mL이 되게 한 후 35℃, 250 rpm에서 진탕배양하여 계속 계대해 주었으며 실험에서는 $OD_{660}$=2인 배양액을 2% (v/v) 접종하여 배양해 주었다. 이 때, 초기 pH는 7.0에 맞추었다.

### 배양

#### 회분식 발효

발효기에서의 배양은 6개의 날개가 달린 impeller가 두 개 장착된 2.5 L 발효기(Korea Fermentor Co., Incheon, Korea)에서 초기 조업 부피를 1.5 L로 하여 실험하였다. 공기는 1.3 vvm, 200 rpm의 조건으로 공급되었다. 조업 중 Silcon oil (Sigma Co. St. Louis, USA.)을 필요에 따라 조금씩 넣어주었으며, 발효를 진행시키면서 적절한 시간 간격을 두고 배양액으로부터 시료를 채취하였다.

#### 내부 필터를 이용한 연속 발효

내부 필터를 이용한 연속발효시에는 접종 배양액으로부터 2%(v/v) 접종하여 조업 부피가 1.5 L가 되도록 하였다. 전체적인 장치의 개략도는 Figure 1에 나타내었다. 접종한 후 균체 농도가 $OD_{660}$=2 정도에 도달할 때 까지 회분식으로 배양하다가 새로운 배지를 peristaltic pump에 의해 연속적으로 공급하면서 필터로부터 튜브 펌프를 이용하여 여과액을 뽑아냈다. 또한 필터가 막히는 것을 방지하기 위해 backflushing을 수행하였다. Backflushing 장치는 하나의 suction pump와 2개의 timer로 구성되어 정방향으로 제 1 timer에 설정된 시간만큼 filtration하였다가 4.5초 동안 정지 후 역방향으로 작동해 backflushing 해주게 고안되어있다. 정방향과 역방향 작동에 의해 여과액이 뽑아지고, 이는 공급하는 새로운 배지의 부피와 같아서 조업부피는 일정하게 유지된다. 여기서 정방향과 역방향 작동 사이에 4.5초 정도 정지시간을 두는 이유는 펌프에 무리를 주지않기 위함이다. 사용한 멤브레인은 총 면적이 360 $cm^2$인 세라믹 필터로서 pore size가 0.1 $\mu$m인 asymmetric type이었다. 실험 후에 필터는 발효조에서 분리하여 1N NaOH 용액으로 수시간 동안 세척한 후 실험 전에 증류수로 재차 세척하여 필터 성능이 원래 상태로 돌아왔는지 유속을 측정하여 재사용하였다.

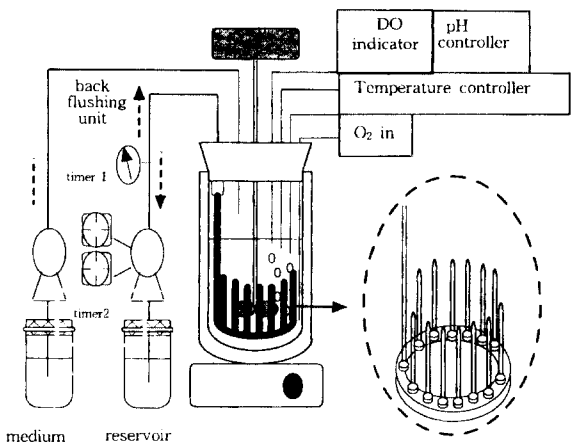


Figure 1. Diagram of the internal membrane bioreactor system.

### 분석

균체 증식은 배양액의 탁도($OD_{660}$)로 측정하였다. 분광분석기로는 Pharmaica Biotech. (Uppsala, Sweden)의 Ultrospec 3000을 사용하였다.

총 단백질의 농도는 Lowry method를 응용한 Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad pacific LTD, Hercules, USA)를 이용하였고 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

BR의 정량 방법은 다음과 같다 (9). 먼저 1-2 mL의 배양액을 취해 원심분리 한 후 상등액을 버리고 0.5-1 mL의 증류수와 0.01 mg의 DNase를 더하여 삼투압에 의하여 균체를 파괴시킨 후 4N NaOH, 4N $NH_4OH$와 시료를 sample:NaOH:$NH_4OH$ = 9:0.5:0.5 이 되도록 넣어 섞는다. 어두운 공간에서 이 때의 흡광도 ($OD_{568}^{0}$)를 568 nm에서 측정한 후 retinal이 PM으로부터 제거되도록 시료에 빛을 쪼여주어 약 24시간이 지난 후 568 nm에서의 흡광도 ($OD_{568}^{24}$)의 차이로 BR을 정량하였다. 이 때 BR의 양은 BR의 분자량 26 kDa과 몰 흡광도 $\varepsilon$ = 63,000$M^{-1}cm^{-1}$을 Bouguer-Beer 법칙에 적용하여 계산하였다 (3).

$$C_{BR} = \frac{OD_{568}^{0} - OD_{568}^{24}}{b \times 63000} \times 26000$$

여기서 $C_{BR}$은 BR의 농도(mg/mL), $b$는 빛의 경로 길이(1 cm)이다.

## 결과 및 고찰

### 회분식 발효

Figure 2에는 회분식 발효에서의 세포 성장과 BR 생산의 결과를 나타내었다. 이 결과는 내부 필터 발효기에서의 결과

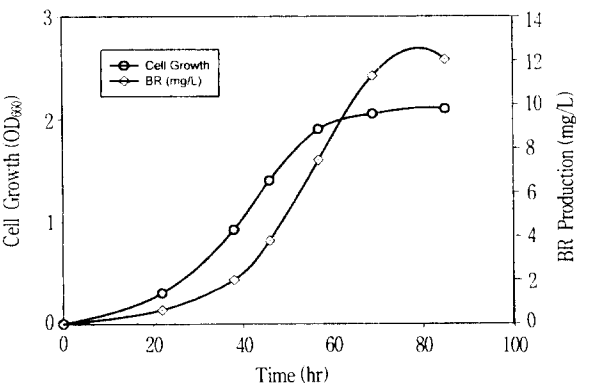


Figure 2. Bacteriorhodopsin (BR) production and cell growth of halobacterium halobium R1 in the batch fermentation (-●-: Cell Growth, -○-: BR Production).

와 비교되었다. 세포 성장은 $OD_{660}$=2 정도였으며 BR은 70시간에 12 mg/L 생산되어 0.2 mg/L · hr의 생산성을 보였다.

### 내부 필터를 이용한 연속발효

먼저 1.5 L 조업 부피에 희석률을 0.033 $hr^{-1}$로 하고 산소를 4-5L air/min으로 공급하면서 실험한 결과를 살펴보면 150시간 동안 $OD_{660}$이 대략 6정도에 도달 한 후 더 이상 자라지 않았고 그 이후에는 멤브레인이 막히는 문제가 발생하여 계속해서 희석률을 증가시키면서 세포의 성장을 관찰하는 실험은 수행하지 못하였다 (Figure 3a). 이 실험에서는 내부 필터의 성능 유지를 위해 300 rpm으로 조업하였으므로 용존산소농도 조절이 용이하지 못하였고, 과다한 공기가 들어가 멤브레인에 압력을 주어 fouling이 더 잘 일어나는 결과를 나타내었다. 세포 성장의 증가가 저조한 만큼 BR의 생산도 저조하여 생산성은 0.3 mg/L · hr 정도였다 (Figure 3b).

그 다음 시도에서는 1.5L 조업 부피에 D=0.066 $hr^{-1}$의 조건으로 조업하였다. 용존산소농도의 조절을 위해 순수한 산소를 같이 공급하였으며 용존산소농도의 값은 20%이상을 유지하도록 하였다. 그 결과 150시간뒤에 $OD_{660}$이 12에 도달하였고 비성장

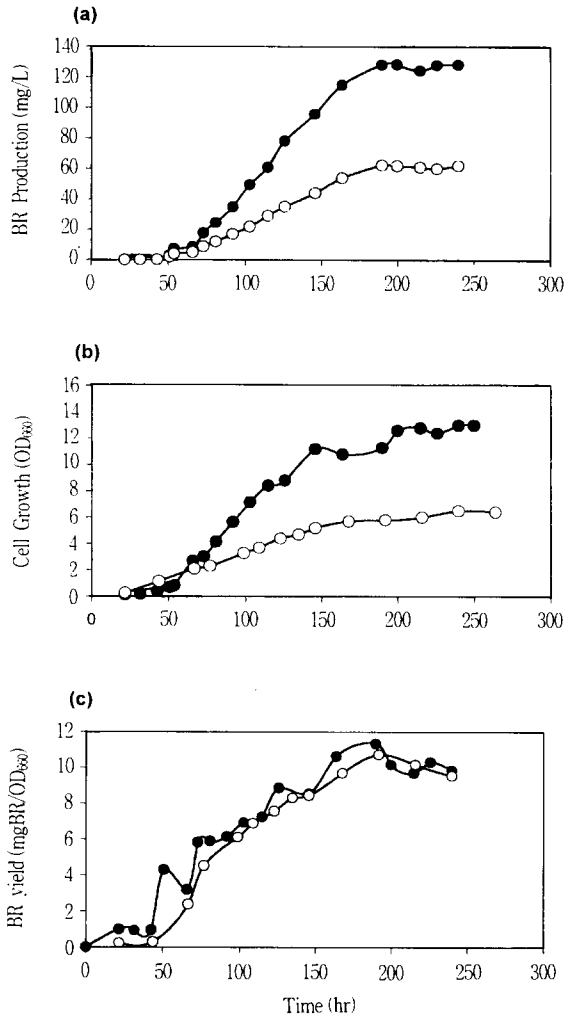


Figure 3. a) Cell growth of halobacterium halobium R1, b) bacteriorhodopsin (BR) production and c) BR yield (-●-: Dilution rate=0.066 $hr^{-1}$, -○-: Dilution rate=0.033 $hr^{-1}$).

속도도 D=0.033 $hr^{-1}$일 때 보다 2 배 정도 빨랐다. 이는 희석률이 2배로 증가한것도 원인이 될 수 있으며, 또한 산소가 cell의 성장에 충분하도록 공급되어 성장이 원만히 진행될 수 있었기 때문으로 생각되어진다. 150시간이 지난 후에는 세포의 성장이 멈추었는데 그 원인을 알아보기 위해 발효기로부터 뽑아낸 여과액을 받아 yeast extract를 넣은 배지와 넣지 않은 배지에 각각 균주를 접종하여 플라스크에 키워본 결과, yeast extract를 넣어준 배지에서는 잘 자랐지만 yeast extract를 넣어주지 않은 배지에서는 세포의 성장이 관찰되어지지 않았다. 이 때 공급되는 기질은 균체의 성장이 아닌 maintenance energy로 쓰임을 알 수 있다. 이 결과로부터 균체의 성장이 멈춘 것은 byproduct inhibition으로 인한 것이 아니라 substrate limitation이 원인이라는 것을 알 수 있다.

Halobacteria는 성장하는데 있어서는 산소가 필요하지만 BR의 생성을 위해서는 용존산소농도가 낮은 조건이 요구된다 (9). 따라서 세포의 성장과 BR의 생성을 동시에 일어나게 할 수 있게 하는 조건 조절에는 어려움이 따른다. 특히 거의 포화상태에 가까운 NaCl을 포함한 현 배지의 경우 용존산소농도가 물의 1/3정도밖에 되지 않음으로 균체의 성장에 필요한 충분한 산소의 공급이 중요한 문제이다. Figure 3에서 보면 접종 후 균주의 성장이 급속히 전개($\mu$=0.025~0.03 $h^{-1}$)되는 100시간 정도까지는 BR의 생성량에 큰 변화가 일어나지 않았지만, 그 이후 130시간까지는 세포 성장이 둔화($\mu$=0.01~0.015 $h^{-1}$)되고 BR의 생성량이 증가하는 추세를 보이고 있다. 이러한 현상이 관찰되어지는 원인을 살펴보면 세포 농도가 낮을 때는 산소의 전달이 원활하여 세포 성장이 활발히 일어나지만, 세포 농도가 올라감에 따라 산소전달이 원활하지 않으므로 부분적인 산소 농도 구배가 발생, BR의 생성이 이루어졌기 때문이다.

150시간이 지나면서는 용존산소농도의 값을 3~7%로 유지하면서 BR의 생성을 유도하였는데, BR의 정량 결과는 Figure 3에 나타내었다. 그림에서 보면 150시간이 지난 후에 BR의 발현은 증가하는 추세를 보이다가 약간 감소하는 현상을 보이는데 이는 실험상의 오차가 발생하였거나, 기질이 다 소모되어 세포의 활성 정도가 불안정해져 BR생성이 일정하지 않았다고 볼 수 있다. 여기에서 BR은 전체 단백질의 약 2.4-2.5%를 차지하고 이는 125-130 mg/L의 생산을 보이는 것으로서 고농도 배양과 함께 BR의 생성 또한 높아서 생산성 (0.7 mg/L · hr)이 높아졌다.

## 요 약

생물전자소자의 재료로 연구 중인 bacteriorhodopsin (BR)을 생산하는 *Halobcaterium halobium* R1의 내부 필터 발효기에 의한 고농도 배양을 시도하였다. 내부 필터를 이용한 연속 발효에서 희석률이 0.066 $hr^{-1}$ 인 경우 150시간이 지난 후에는 $OD_{660}$=12에 도달하였으며 그 이후에는 substrate가 limitation되어 성장이 둔화되었다. 여기에서 BR은 전체 단백질의 약 2.4-2.5%를 차지하고, 125-130 mg/L의 생산량을 나타내었다. 이것은 회분식 발효시 생산성 (0.2 mg/L · hr)의 3.5배에 해당하는 것 (0.7 mg/L · hr)으로 세포 성장의 증가로 BR의 생산성이 증가하였다.

## 감 사

본 연구는 삼성종합기술원의 96년도 멀티미디어 미래연구과제

의 일부로 수행되어 재정적 지원을 받았음을 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Oesterhelt, D., C. Brachle, and N. Hampp (1991), Bacteriorhodopsin : A Biological Material for Information Processing, *Quarterly Rev. Biophys.*, **24**, 425-478.
2. Miyasaka, T., K. Koyama, and I. Itoh (1992), Quantum Conversion and Image Detection by a Bacteriorhodopsin-based Artificial Photoreceptor, *Science*, **255**, 342-344.
3. Oesterhelt, D. and W. Stoceckenius (1974), Isolation of the Cell Membrane of *Halobacterium halobium* and Its Fractionation into Red and Purple Membrane, *Methods Enzymol.*, **31**, 667-678.
4. Onishi, M., M. E. McCance, and N. E. Gibbons (1965), A Synthetic Medium for Extremely Halophilic Bacteria', *Can. J, Microbiol.*, **11**, 365-373.
5. Gochnauer, M. B. and D. J. Kushner (1969), Growth and Nutrition of Extremely Halophilic Bacteria, *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1157-1165.
6. 엄영순, 박준택, 이상엽, 장호남 (1997), 박테리오로돕신 생산을 위한 *Halobacterium halobium* R1의 배양시 복합질소원 및 아미노산의 효과, *한국생물공학회지*, **12**(3), 304-308.
7. 엄영순, 박준택, 이상엽, 장호남 (1997), 박테리오로돕신 생산을 위한 *Halobacterium halobium* R1의 배양시 글리세롤 및 배양조건의 영향, *한국생물공학회지*, **12**(3), 309-313.
8. Chang, H. N., W. G. Lee, and B. S. Kim (1993), Cell Retention Culture with an Internal Filter Module:Continuous Ethanol Fermentation., *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 677-681.
9. Shand , R. S. and M. C. Betlach (1991), Expression of the *bop* gene Cluster of *Halobacterium halobium* is Induced by Low Oxygen Tension and by Light, *J. Bacteriol.*, **173**, 4692-4699.