

유전자 재조합 대장균에 의한 5-Aminolevulinic Acid (ALA)의 생산 및 공정 모니터링

II. 2차원 형광센서에 의한 공정 모니터링

^{1,3}정 상 윤 · ^{1,3}임 용 식 · ⁴정 상 욱 · ^{2,3†}이 종 일

전남대학교, ¹물질생물화공과, ²응용화학공학부, ³생물공정기술연구실, ⁴산업공학과
(접수 : 2003. 9. 27., 게재승인 : 2004. 2. 24.)

Production and Process Monitoring of 5-Aminolevulinic Acid (ALA) by Recombinant *E. coli*

II. Process Monitoring by a 2-Dimensional Fluorescence Sensor

Sang-Yun Chung^{1,3}, Yong-Sik Lim^{1,3}, Sang-Wook Chung⁴, and Jong Il Rhee^{2,3†}

¹Department of Materials and Biochemical Engineering, ²Faculty of Applied Chemical Engineering, ³Bioprocess Technology Lab. ⁴Department of Industrial Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2003. 9. 27., Accepted : 2004. 2. 24.)

2-Dimensional fluorescence sensor has a wide range of excitation and emission wavelengths, that some biogenic fluorophors in a biological process can be monitored simultaneously. The production processes of 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pLysS harboring plasmid pFLS45 were on-line monitored by a 2-dimensional fluorescence sensor. The characteristics of fluorescence spectrum was dependent upon physical and biological factors of a bioprocess such as culture pH, cell mass etc. Some off-line data were correlated to the fluorescence intensity well, which was monitored at some combination of excitation and emission wavelengths by the 2-dimensional fluorescence sensor.

Key Words : 2-Dimensional fluorescence sensor, ALA production, recombinant *E. coli*

서 론

미생물의 성장 및 대사산물의 생산은 생물 공정 내 각종 공정변수, 즉 pH, 온도, 용존산소농도, 전구체의 농도 등에 의해 크게 영향을 받는다. 따라서 생물 공정의 생산성 증대, 효과적인 제어 등을 위해 각종 공정변수를 실시간 모니터링 할 필요가 있다(1, 2). 특히, 미생물의 성장이 빠른 유전자 재조합 균주를 이용하여 ALA를 생산하는 공정에서 생물 반응기내 균체 성장이나 대사산물을 온라인 모니터링 하는 것은 매우 중요하다.

온라인 모니터링 기술에는 pH 센서나 용존산소 센서 그리고 각종 광학센서 등을 이용한 인시투 (in-situ) 모니터링 기

술이 잘 알려져 있으며 그밖에 흐름주입분석기술 (FIA, Flow Injection Analysis)이나 각종 분석 자료들과 소프트웨어를 이용하는 가상 분석법 (Virtual measurements, Software sensor) 등이 있다(3). 각종 광학센서 (예; 분광광도계, 형광센서, 광학밀도 측정센서 등)를 이용하는 인시투 모니터링 기술은 샘플 채취가 필요하지 않은 비침투법 기술 (noninvasive technology)로서 생물공정에 영향을 주지 않고 전자기장에 의한 간섭이나 멸균에 따른 감도 변화가 적으므로 각종 공정에 효과적으로 적용되고 있다(3, 4).

특히, 형광센서는 균체량의 측정이나 반응 특성 분석, 생물공정의 모니터링 등을 위해 1980년대부터 이용되고 있는데(3, 5), 기존의 형광 센서는 여기 (excitation) 파장과 방출 (emission) 파장을 고정하여 한 종류의 형광 물질만을 측정하였다. 그러나 생물 공정 내 균체 및 발효액 중에는 각종 대사물질, 비타민, 단백질 등이 존재하며 발효액의 pH, 온도 등 공정 변수의 변화에 따라 형광 파장 영역이나 형광 세기가 변화하기도 한다. 따라서 고정된 여기/방출 파장만을 이

† Corresponding Author : Faculty of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1847, Fax : +82-62-530-0846

E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

용하는 기존의 형광 센서로는 생물 공정을 효과적으로 모니터링하는데 많은 어려움이 있다. 따라서 최근 다양한 범위의 여기 파장과 방출 파장을 측정할 수 있는 2차원 형광센서 (2-dimensional fluorescence sensor)가 개발되어 생물 공정 내 각종 형광 파장 영역의 물질을 모니터링 하는데 사용되고 있다(1, 4, 5). 즉, 2차원 형광센서는 공정내 존재하는 NAD(P)H와 같은 조효소와 pyridoxin, riboflavin 등의 비타민 그리고 tryptophan, tyrosine과 같은 아미노산 등 각종 형광 물질을 동시에 측정할 수 있으며 측정 시간이 빠르므로 생물공정의 온라인 모니터링에 효율적으로 적용할 수 있다. Mukherjee 등은 2차원 형광 센서를 이용하여 *Enterobacter aerogenes*의 배양공정에서 산소 농도에 따른 NAD(P)H 등 대사물질의 변화 특성을 조사하였다(6). 또한 Skibsted 등은 배 가스 중의 산소 및 이산화탄소 농도와 배양액중의 숙신산 농도, 단백질량, 균체량 등을 예측하기 위해 2차원 형광 센서기술과 통계적인 분석방법을 이용하였다(7). 그밖에 기질의 형광 특성을 이용하여 준 거울상 이성질 (quasi-enantiomeric) 효소 반응을 모니터링하거나(8), GFP (Green Fluorescence Protein)을 도입한 대장균을 모니터링하여 유전 독성 (geno-toxicity)을 측정한 연구가 보고되었다(9). 국내 연구의 경우 *Aspergillus terreus*에 의한 이타콘산의 생산 공정에서 배양액의 인산 농도와 균체량 및 이타콘산의 생산성을 모니터링하기 위해 2차원 형광 센서가 이용되었다(10).

국내외의 ALA 생산 연구는 새로운 미생물을 선별, 분리하거나 유전자 재조합 등으로 미생물을 개량하는 방법에 중점을 두고 있으며 공정의 모니터링을 통한 ALA 생산 기술 개발 연구는 전혀 이루어지지 않고 있다. 그러나 2차원 형광센서를 이용하여 ALA 생산 공정을 실시간 모니터링 함으로써 공정 내 균체의 성장 및 ALA의 생산특성을 고찰할 수 있으므로 ALA 생산성 향상에 큰 의미가 있다. 본 연구에서는 ALA 생합성의 전구체 (숙신산, 글리신)와 포도당의 소모 속도, 미생물의 성장이나 ALA의 생산 특성 등을 모니터링 할 뿐만 아니라 ALA의 생산에 직접 관련된 효소, ALAS와 ALAD의 활성변화 등을 분석하기 위해 2차원 형광센서를 이용하여 ALA의 생산 공정을 온라인 모니터링 하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

ALA 생산 공정의 모니터링 실험에 사용한 균주 및 배지는 이전의 논문(11)에 자세히 설명되었다.

발효 장치 및 분석방법

생물반응기내 미생물 및 배양액의 형광특성 변화를 모니터링하기 위한 2차원 형광센서로는 형광 광도계 (Fluorescence spectroscopy, Model F-4500, Hitachi Co. Japan)를 사용하였다. 생물반응기 (KoBiotech Co., 2.5 or 7 L)는 외부의 빛을 차단하기 위해 스테인리스로 제작하였는데 측면에는 bifurcated 액체 광학 전도관 (liquid light conductor, Lumatek Co. Germany)에 직접 연결할 수 있도록 석영창을 설치하였다. 생물 반응기와 함께 사용한 형광센서 등의 온라인 모니

터링장치는 Fig. 1에 나타내었으며 2차원 형광센서의 조각 매개변수 값은 Table 1에 나타내었다. ALA의 생산에 관련된 각종 물질의 분석 방법은 이전의 논문에 설명되었다(11).

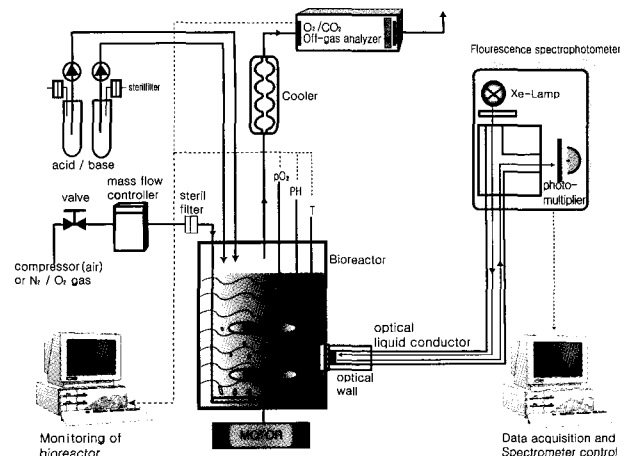


Figure 1. Schematic setup of a bioreactor with 2-D fluorescence sensor and other monitoring equipments.

Table 1. Measurement conditions of 2-dimensional fluorescence sensor

Measurement conditions	Fluorescence sensor, based on F-4500 (Hitachi)
Lamp	150 W Xe
Photomultiplier voltage (V)	900
Area of excitation (nm)	250 ~ 650
Area of emission (nm)	280 ~ 650
Setting of wavelengths	Monochromator
Step width of excitation and emission (nm)	10
Excitation slit (nm)	10
Emission slit (nm)	10
Scan speed (nm/min)	30000

결과 및 고찰

세포 성장 및 배양 조건에 따른 형광 특성

생물 공정 내 미생물 및 배양액에 의한 형광은 광범위한 파장 영역에서 나타나며 방출되는 파장에 따라 형광의 간섭과 겹침 현상이 일어나기 쉽다. 또한 발효액의 pH, 용존산소, 교반속도 및 거품 그리고 세포의 종류와 성장 정도 등 각종 물리, 화학적인 조건에 따라 형광 영역 및 세기가 변화한다 (2, 5, 6).

Fig. 2에는 본 연구에서 사용한 균주의 GFP 형광 특성과 형광 스펙트럼의 개략적인 영역을 도시하였다. 발현된 GFP는 작은 폴리펩타이드 (≒238개의 아미노산, 27 kDa)로서 주로 세포내 단백질로 발현된다(12). 본 실험에서 사용한 재조합 균주의 경우 Fig. 2(A)에서와 같이 녹색 빛을 띠고 있으므로 GFP 유전자를 갖지 않는 세포와 쉽게 구별된다. 또한, Fig. 2(B)의 형광 스펙트럼에 보인 바와 같이 GFP의 형광은 여기 (excitation) 파장 490 nm에서 빛을 받아 방출 (emission) 파장 510 nm에서 강한 형광을 발하게 되며 형광 세기는 여기

파장 350-520 nm과 방출 파장 470-570 nm 영역에 넓게 분포하고 있는 것을 볼 수 있다. 세포의 성장에 따라 생성되는 각종 조효소 (e.g. NAD(P)H)와 각종 아미노산 등 단백질의 농도 변화에 따라 형광 스펙트럼의 세기는 변화하게 된다. Fig. 3에는 재조합 대장균을 MS8 배지에서 배양한 경우 배양초기 (0시간) 와 배양 12시간에서 형광 스펙트럼 세기와 두 스펙트럼의 차이를 나타내었다. 반응기내 세포가 성장함에 따라 NAD(P)H 및 플라빈 등 조효소 와 GFP, 아미노산

등 단백질 영역에서 형광 세기가 증가함을 볼 수 있다.

각종 화합물의 첨가에 따른 형광 특성

재조합 대장균에 의한 ALA 생산 공정에서 유도발현 물질인 IPTG, ALAD 저해제인 LA 그리고 기질 (포도당, 숙신산) 첨가에 따른 형광 특성변화를 살펴보았다. 첨가물이 모두 형광물질이 아니므로 각 물질의 고유한 형광 세기 변화는 없지만 화합물의 첨가가 균체의 성장이나 세포내 대사현상에 영

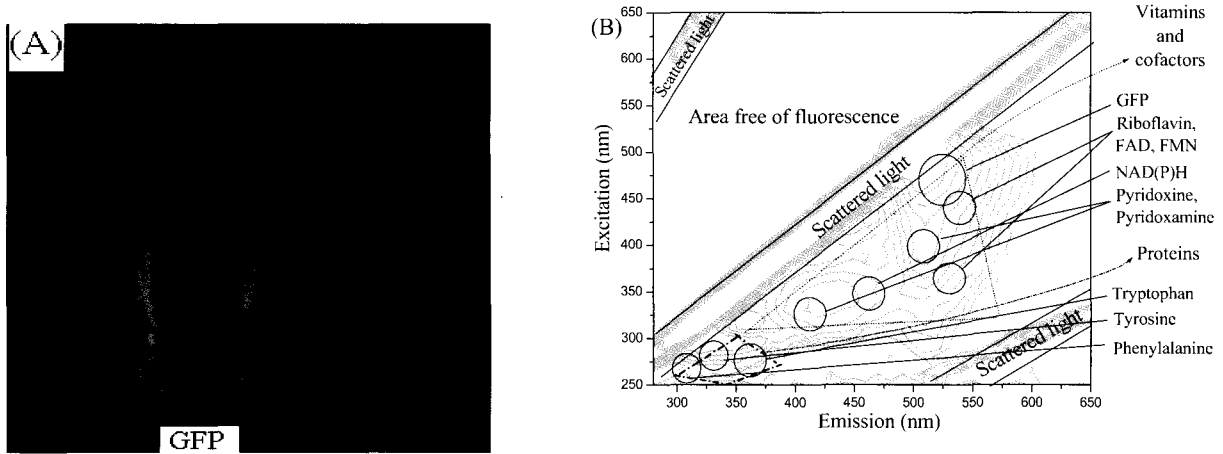


Figure 2. Fluorescence photography of recombinant *E. coli* [DE3] (A), biogenic fluorescence in 2-D fluorescence spectrum (B).

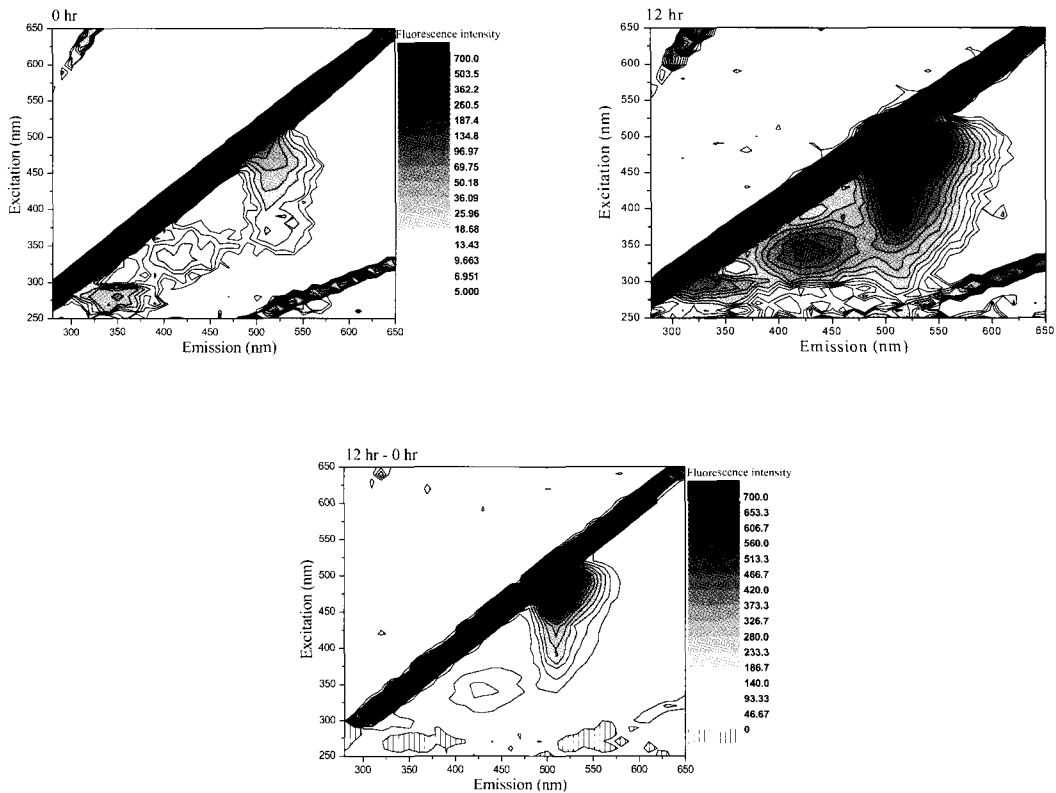


Figure 3. 2-D fluorescence spectra of recombinant *E. coli* with MS 8 medium (0, 12 hr) and subtraction of two spectra(12 - 0 hr).

향을 미치므로 형광 스펙트럼의 변화를 볼 수 있다.

Fig. 4에는 IPTG와 LA, 기질을 첨가한 주요 시간대에서 2차원 형광 스펙트럼 세기의 차이를 보였다. 지수성장기인 11.3 시간에 IPTG를 첨가한 경우(Fig.4(A)), IPTG를 첨가하기 직전의 형광 스펙트럼과 첨가한 직후 스펙트럼을 뺀 후 형광 세기의 변화를 살펴보면 IPTG 첨가로 인해 균체성장이 원활하지 못하여 GFP 형광 영역 (490 nm(ex)/510 nm(em))과 조효소 영역 (350 nm(ex)/450 nm(em), 330 nm(ex)/400 nm(em))에서 형광 세기가 다소 증가할 뿐 대부분의 파장 영역에서 형광세기의 변화는 거의 없거나 감소하였다. 세포성장 정지기에 LA를 첨가하였을 때 세포 성장에 따른 형광세기의 변화는 거의 없었으나 GFP 형광 영역에서 형광 세기가 조금 증가할 뿐 다른 파장영역에서 형광세기는 감소함을 알 수 있었다(Fig 4(B)). 그러나 지수성장기에 포도당과 숙신산을 첨가한 경우 대부분의 형광파장에서 형광세기가 감소하였지만 포도당 첨가에 따른 균체 성장으로 NAD(P)H 영역 (340 nm (ex)/430 nm(em))과 GFP 영역에서 형광세기가 증가함을 볼 수 있다.

이와 같이 발효공정에 각종 화합물의 첨가로 인해 발생하는 각 형광 파장 영역에서 형광 세기의 변화는 균체의 성장, 유전자 발현 및 세포 대사 과정 등을 추정할 수 있는 지표가 될 수 있다.

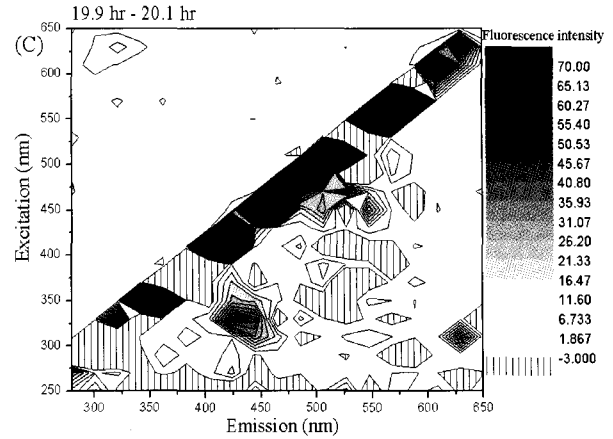
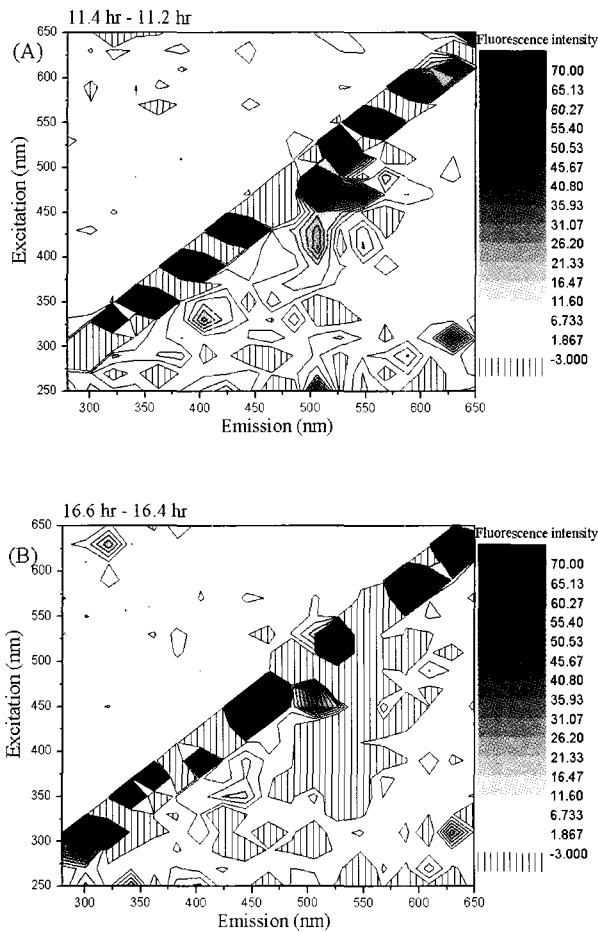


Figure 4. Difference of fluorescence spectra of recombinant *E. coli* with (A) 0.4 M IPTG added at 11.3 hr, (B) 30 mM LA added at 16.5 hr, (C) 30 mM glucose and 30 mM succinic acid added at 20 hr.

실시간 모니터링 된 형광 스펙트럼과 공정 변수와의 상관관계

생물반응기에 직접 연결한 2차원 형광센서를 이용하여 비침투법 방식으로 ALA 생산 공정을 매 3.6분마다 (측정시간 1.6분포함) 온라인 모니터링 하여 모니터링이 이루어졌으며 각 파장별 형광 세기의 변화를 생물 반응기내의 각종 공정 변수와 상관시켰다.

Fig. 5에는 MS8 배지를 이용한 배양 실험에서 360 nm (ex)/450 nm(em) 및 450 nm(ex)/550 nm(em), 420 nm(ex)/520 nm(em)에서 형광 세기의 변화가 균체량과 ALA 생산 농도와 좋은 상관성을 보였다. 또한 GFP 형광영역인 490 nm(ex)/510 nm(em)과 420 nm(ex)/570 nm(em)에서 형광세기의 변화는 각각 세포내 단백질 농도와 CFU와 좋은 상관성을 보였다(Fig. 6(A)). 한편, 세포내 효소 중에서 ALAD의 활성은 tryptophane 과 같은 아미노산/단백질 영역 (300 nm(ex)/330 nm(em))에서 형광세기의 변화와 좋은 상관성을 보였으며 ALAS의 활성은 380 nm(ex)/600 nm(em) 에서 형광세기의 변화와 상관성을 나타내었다(Fig. 6(B)). 최소배지인 MS8 배지는 배지 자체의 형광 세기가 약하거나 거의 나타나지 않으므로 포도당과 같은 기질의 소모정도는 조효소 NAD(P)H 영역인 340 nm(ex)/430 nm(em)에서 형광세기 증가하는 경향과 반대로 생각할 수 있다. 즉, Fig. 7에서와 같이 NAD(P)H 등의 조효소는 세포성장 및 대사활성 및 밀접한 연관을 보이므로 기질 감소에 따라 형광 세기는 증가하며 기질이 고갈되는 시간에서부터 형광세기는 점차 감소하는 경향을 나타내게 된다.

한편, 형광스펙트럼의 세기는 배양액의 pH에 영향을 받는데 본 연구에서 균체량은 동일파장에서 상관성을 찾을 수 있었지만 ALA 농도는 배양액의 pH를 조절하지 않는 경우 (Fig. 5(A))에는 형광 파장 450 nm(ex)/550 nm(em)에서 상관성을 찾을 수 있었고 배양액의 pH가 5.0으로 조절된 경우 (Fig. 5(B)) 420 nm(ex)/520 nm(em)는 ALA 농도와 상관성을 보였다.

요약

본 연구에서는 2차원 형광 센서를 이용하여 ALA 생산 공정을 실시간 모니터링하고 오프라인 분석 데이터와 비교, 고찰하였다. 배양액의 pH나 균체의 성장 특성 등 생물공정내의 환경 변화에 따라 형광 특성에 차이를 보였으며 최소배지인 MS8 배지에 IPTG, LA 및 기질 (포도당, 숙신산) 등을 첨가한 후 형광 특성의 변화를 살펴본 결과 균체의 성장이나 세

포내 대사현상의 변화를 형광 차이로부터 확인할 수 있었다. 2차원 형광센서에 의해 실시간 모니터링 된 형광 스펙트럼 데이터는 기질 및 생산물 그리고 세포내 효소 활성 등의 각종 공정 변수와 좋은 상관성을 보였다. 따라서 본 연구에서 사용한 2차원 형광센서는 ALA 대량 생산을 위해 주요한 공정변수를 실시간 모니터링 하는데 매우 효과적이라 할 수 있으며 향후 공정의 제어 및 최적화에도 이용될 수 있다.

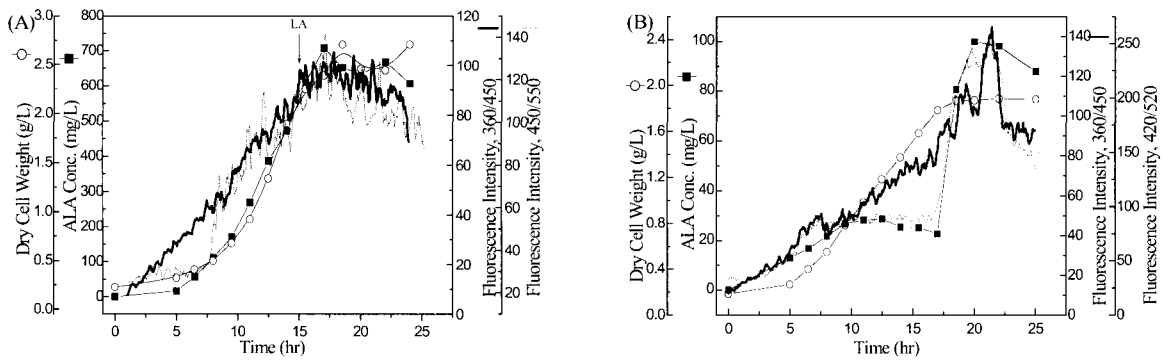


Figure 5. Correlation between on-line monitored fluorescence data and off-line data (cell mass, ALA concentration) (A) with MS8 medium added LA without pH control, (B) with MS8 medium at pH 5.0.

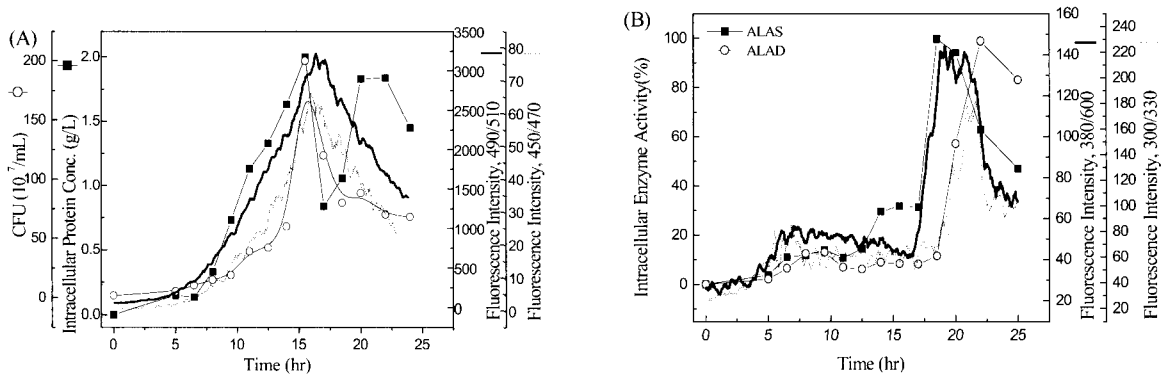


Figure 6. Correlation between on-line monitored fluorescence data and intracellular enzyme activity with MS8 medium at pH 5.0.

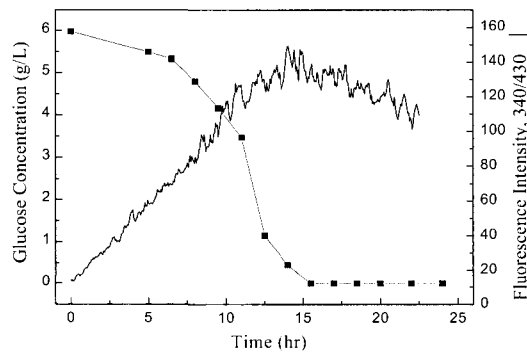


Figure 7. Correlation between on-line monitored fluorescence data and glucose concentration with MS8 medium.

감 사

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

REFERENCES

1. Marose, S., C. Lindemann, and Th. Scheper (1998), Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring, *Biotechnol. Prog.* **14**, 63-74.
2. Rhee, J. I., S. Y. Chung, and K. H. Seo (2001), Monitoring of biological processes by 2-dimensional fluorescence sensor, *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **16**, 493-499.
3. Harms, P., Y. Kostov, and G. Rao (2002), Bioprocess monitoring, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 124-127.
4. Marose, S., C. Lindemann, R. Ulber, and Th. Scheper (1999), Optical sensor systems for bioprocess monitoring, *Trends Biotechnol.* **17**, 30-33.
5. Lindemann, C., S. Marose, H. O. Nielson, and Th. Scheper (1998), 2-Dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring, *Sen. Actuat. B.* **51**, 271-277.
6. Mukherjee, J., C. Lindemann, and Th. Scheper (1999), Fluorescence monitoring during cultivation of *Enterobacter aerogenes* at different oxygen levels, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 489-494.
7. Skibsted, E., C. Lindemann, C. Roca, and L. Olsson (2001), On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration, *J. Biotechnol.* **88**, 47-57.
8. Knuttel, T., Th. Hartmann, H. Meyer, and Th. Scheper (2001), On-line monitoring of a quasi-enantiomeric reaction with two coumarin substrates via 2D-fluorescence spectroscopy, *Enz. Microb. Technol.* **29**, 150-159.
9. Bartolome, A. J., R. Ulber, T. Scheper, E. Sagi, and S. Belkin (2003) Genotoxicity monitoring using a 2D-spectroscopic GFP whole cell biosensing system, *Sens. Actuat. B.* **89**, 27-32.
10. Chung, S. Y. and J. I. Rhee (2002), Production and monitoring of itaconic acid from starch materials, *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **5**, 477-483.
11. Chung, S. Y., K. H. Seo, K. A. Han, S. H. Cho, K. Bak, and J. I. Rhee (2004), Production and process monitoring of 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli*, I. Characteristics of ALA production(in press).
12. Margolin, W. (2000), Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells, *Methods*, **20**, 62-72.