

재조합 *Alcaligenes eutrophus* 균주 개발 및 Poly(3-hydroxybutyrate) 생산에 관한 연구

최종일 · 이상엽[†]

한국과학기술원 화학공학과
(1997년 3월 21일 접수, 1997년 7월 4일 채택)

Development of Recombinant *Alcaligenes eutrophus* for the Production of Poly(3-hydroxybutyrate)

Jong-il Choi and Sang Yup Lee[†]

Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced
Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea
(Received 21 March 1997; accepted 4 July 1997)

요 약

미생물에 의해 생산되는 환경친화 고분자물질 poly(3-hydroxybutyrate)[P(3HB)]의 생산성 향상을 위하여, 생산균주인 *Alcaligenes eutrophus*에 대해서 재조합 유전자 기술을 이용한 P(3HB) 생합성 효소들의 과다 발현에 의한 균주 개량과 개발된 재조합 *A. eutrophus*에서의 P(3HB) 합성능 향상을 연구하였다. P(3HB) 생합성 효소들이 과다발현된 재조합 *A. eutrophus*의 제작을 위하여 broad-host-range plasmid pVK101에 P(3HB) 생합성 유전자들을 결합하여 vector system을 제작하였고, electroporation에 의한 방법으로 10^3 transformant/ μ g 유전자의 높은 형질 전환 기술을 확립하였다. 재조합 *A. eutrophus*의 P(3HB) 합성능은 높은 질소원에 대한 탄소원의 몰비율(C/N)에서는 낮은 세포 성장과 P(3HB) 농도를, 낮은 C/N 몰비율에서는 낮은 P(3HB) 함량을 나타내었다. 20 g/L의 glucose를 이용한 회분식 배양에서 재조합 *A. eutrophus*와 야생형 *A. eutrophus*의 P(3HB) 합성능을 비교연구한 결과, 재조합 *A. eutrophus*의 경우 야생형보다 높은 최종 P(3HB) 농도, P(3HB) 함량, 그리고 P(3HB) 합성속도를 보였다.

Abstract—In order to improve the productivity of poly(3-hydroxybutyrate)[P(3HB)], *Alcaligenes eutrophus* was metabolically engineered to amplify the activities of the three enzymes involved in the synthesis of P(3HB). The *A. eutrophus* P(3HB) biosynthesis genes coding for P(3HB) synthase, β -ketothiolase, and reductase were cloned into a broad-host-range plasmid pVK101. Recombinant *A. eutrophus* strain was developed by transforming with this plasmid by electroporation. The efficiency of transformation was in an order of 10^3 transformants/ μ g DNA. In flask cultures, the final cell concentration of recombinant *A. eutrophus* decreased with increasing carbon/nitrogen(C/N) molar ratio. On the other hand, P(3HB) concentration was highest at the medium C/N molar ratio. For the fixed nitrogen concentration, the concentrations of cell and P(3HB) increased with increasing glucose concentration. Comparison of cell growth and P(3HB) production by recombinant and wild type *A. eutrophus* in batch culture showed that the final P(3HB) concentration, P(3HB) content, and P(3HB) synthesis rate were all higher in the recombinant strain compared with the wild type.

Key words: Poly(3-hydroxybutyrate), Recombinant *Alcaligenes eutrophus*, P(3HB) Synthesis Genes, Enzyme Amplification

1. 서 론

페플라스틱으로 인한 환경오염문제를 해결하기 위한 방안으로 기존의 석유합성 플라스틱을 대체할 수 있는 생분해성 플라스틱의 개발을 위한 연구가 전세계적으로 수행되고 있다. 현재 연구되어지고 있는 여러 생분해성 고분자들 가운데서 polyhydroxyalkanoates(PHA)는 과잉의 탄소원 존재하에 질소나 인과 같은 영양분이 제한될 경우 많은 미생물들이 탄소원 및 에너지 저장물질로서 합성·축적하는 hydroxyalkanoates로 이루어진 고분자 물질이다[1]. PHA는 현재 사

용되고 있는 합성고분자와 유사한 기계적 물성을 가지며 일상적인 자연환경하에서 완전한 생분해가 일어나기 때문에, 환경문제 해결을 위한 합성고분자의 대체물질로서 많은 관심을 끌고 있다[2, 3]. 또한 PHA는 단량체의 구조에 따라 유리전이 온도, 녹는점, 신장 강도, 연신율 등이 크게 변하기 때문에 열가소성 수지에서부터 탄성체에 이르기까지 넓은 용도로 사용될 수 있다[4].

PHA 가운데서 가장 대표적인 poly(3-hydroxybutyrate)[P(3HB)]는 polypropylene과 유사한 기계적 물성을 가지고 있으며 여러 미생물들이 합성한다고 보고되었다[1, 2]. P(3HB)와 poly(3-hydroxyvalerate)

의 공중합체로 이루어진 Biopol™은 영국의 Zeneca Bio Product에서 산업적으로 생산되었으며, 삼푸병이나 일회용 면도기 등의 용도로써 판매되었다[3]. 하지만 미생물을 이용하여 생물학적 방법으로 생산되는 P(3HB)는 상용 합성고분자들에 비해서 매우 높은 생산 단가를 가진다는 문제점을 가지고 있다. 이러한 높은 생산단가의 절감을 위해 신규 P(3HB) 합성 균주의 분리, 대사공학에 의한 합성 균주의 개발, 고효율 생물학적 생산(발효) 기술 개발, 경제적인 분리·정제 공정의 개발 등에 관한 연구가 전 세계적으로 진행되고 있다[2,3].

본 연구에서는 P(3HB)의 생산성 향상을 위하여 P(3HB) 생산균주로 가장 널리 알려진 *Alcaligenes eutrophus*를 재조합 유전자 기술을 이용하여 P(3HB) 생합성 관련 효소들의 homologous amplification이 이루어진 재조합 균주를 개발하였다. 재조합 *A. eutrophus* 균주의 개발을 위하여 P(3HB) 생합성 유전자들을 포함한 vector system의 개발과 *A. eutrophus*로의 형질 전환 기술을 연구하였다. 또한 개발된 재조합 *A. eutrophus*의 P(3HB) 생산 특성과 야생형 균주와의 P(3HB) 생산능을 비교하여 연구하였다.

2. 이 론

P(3HB)를 합성하는 많은 박테리아에 대해서 서로 다른 몇 개의 대사 경로가 존재한다고 알려져 있다[5]. *A. eutrophus*내의 생합성 경로는 가장 널리 알려진 3 단계 생합성 경로로서 acetyl-CoA로부터 P(3HB)로 생합성되는 경로이다. 세포내에서 acetyl-CoA는 β -ketothiolase를 촉매로하여 생물학적 Claisen condensation에 의해 carbon-carbon 결합이 형성된다. 이러한 첫 번째 반응에 의해 형성된 acetoacetyl-CoA는 NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase에 의해 입체선택적으로 환원되어져 D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA로 변환된다. 이 D(-)-3-hydroxybutyryl moiety는 P(3HB) synthase라는 효소의 촉매작용에 의해 polyester 분자에 ester 결합을 하게 된다.

이러한 *A. eutrophus* 내에서 P(3HB) 생합성 효소들, β -ketothiolase, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase, P(3HB) synthase, 을 coding하는 유전자들(각각 *phbA*, *phbB*, *phbC*)은 무리를 이루고 있다고 알려져 있으며, 1988년 세 개의 서로 다른 연구자들에 의해 cloning되었다[6-8]. 이 세 유전자들은 하나의 operon을 이루어 *phbC* (1767 bp 크기)-*phbA* (1179 bp 크기)-*phbB* (738 bp 크기)의 순으로 되어 있으며, *phbC* 앞부분의 promoter에 의해서 전사가 진행된다.

따라서 이러한 *A. eutrophus*내의 P(3HB) 생합성 대사회로를 이용하여, 본 연구에서는 P(3HB) 생합성능 향상을 위하여 생합성 효소들의 활성도 향상을 연구하였다. *A. eutrophus*의 P(3HB) 생합성 효소들의 유전자들을 포함하는 vector를 제작하고, 이를 이용하여 야생형 *A. eutrophus* 균주를 형질 전환하여 재조합 *A. eutrophus*를 제작하였다. Vector내의 P(3HB) 생합성 유전자들의 전사는 *A. eutrophus*내의 염색체 유전자에 존재하였던 선천 promoter를 그대로 이용하였다. 형질 전환된 재조합 *A. eutrophus*는, 염색체 유전자내에 원래 존재하는 P(3HB) 생합성 유전자들과 함께 새로 도입된 vector내의 P(3HB) 생합성 유전자들로부터 만들어진 생합성 효소들의 활성도를 모두 가지게 된다. 이러한 개발된 재조합 *A. eutrophus*에서의 P(3HB) 생합성 효소 활성도의 변화와 P(3HB) 생합성능의 영향을 야생형 *A. eutrophus* 균주와 비교하여 연구하였다.

3. 실험방법

3-1. Bacterial strains과 plasmid

A. eutrophus H16으로부터 유도된 glucose 이용 돌연변이주인 *A. eutrophus* NCIMB 11599를 P(3HB) 생산균주로써 이용하였다[9]. 재

조합 *A. eutrophus*의 형질 전환을 위한 vector는 broad-host-range plasmid pVK101을 이용하여 제작하였다. pVK101은 tetracycline(Tc)과 kanamycin(Km) resistance 유전자를 가지고 있는 21.3 kb 크기의 plasmid이다[10]. *A. eutrophus*의 P(3HB) 생합성 유전자는 Schubert 등 [7]이 *A. eutrophus* H16으로부터 cloning한 β -ketothiolase, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase, 그리고 P(3HB) synthase를 모두 가지고 있는 염색체 유전자 단편(*phbC-A-B*)을 사용하였다. P(3HB) 합성 유전자들을 pVK101의 *EcoR* I site에 cloning하여 얻은 plasmid (Fig. 1)를 pVK101-PHB라 명명하였다. Plasmid 유전자의 특성화와 유전자 조작을 위해 사용된 대장균은 BRL사의 DH5 α [*sup E44* Δ *lacU* 169(ϕ 801*lacZ* Δ *M15*)*hsdR17recA1endA1gyrA96thi⁻¹relA1*]를 사용하였다.

3-2. 배지 및 시약

유전자 조작을 위한 균체 증식은 *A. eutrophus*의 경우 NB 배지를 사용하여 30 °C에서 배양하였으며, 대장균의 경우에는 LB(Luria-Bertani)배지에서 37 °C로 배양하였다. NB 배지는 Difco사의 Nutrient Broth를 8 g/L의 농도로 사용하였고, LB 배지의 조성은 Difco사의 Tryptone 10 g/L, Difco사의 Yeast extract 5 g/L, 그리고 Sigma사의 sodium chloride 10 g/L를 사용하였다. Plasmid를 갖는 재조합 균주는 대장균이나 *A. eutrophus* 모두에 대해서 12.5 μ g/mL의 Tc가 첨가된 배지에서 배양하였다.

P(3HB) 생합성을 위하여 사용된 특정배지(R 배지)의 조성은 아래에 나타내었다[9]. 특정 배지의 pH는 6.8로 조절하였다.

Glucose, 20 g/L; (NH₄)₂HPO₄, 4 g/L; KH₂PO₄, 13.3 g/L; citric acid, 1.7 g/L; MgSO₄·7H₂O, 1.2 g/L; trace element solution, 10 mL/L(1 liter 당 FeSO₄·7H₂O, 10 g; ZnSO₄·7H₂O, 2.25 g; CuSO₄·5H₂O, 1 g; MnSO₄·4H₂O, 0.5 g; CaCl₂·2H₂O, 2 g; Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.23 g; (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1 g; 25 % HCl, 10 mL)

고체평판 배지는 각각의 배지에 15 g/L의 Bacto-agar(Difco사)를 첨가하여 만들었다. 특정 배지에서 glucose와 MgSO₄ 또는 agar는 침전이 형성되는 것을 방지하기 위하여 다른 구성물과 분리되어 autoclave하였다.

유전자 조작을 위하여 사용된 low-melting-temperature agarose는 Promega사의 제품을 사용하였으며, 각종 제한 효소와 T4 DNA ligase들은 New England Biolab과 Boehringer Mannheim사의 제품을 구입하여 사용하였다.

3-3. P(3HB) 생산을 위한 배양조건

Flask 배양은 250 mL의 erlenmeyer flask를 이용하여 50 mL 배지에 균주를 배양하여 실험하였다. *A. eutrophus*와 재조합 *A. eutrophus* 모두의 경우 온도는 30 °C, 교반은 300 rpm으로 rotary shaker를 이용하였다. 발효기를 이용한 회분식 배양은 2.5 L의 jar fermentor(한국 발효기)를 이용하여 실험하였다. pH 조절은 4 N NaOH를 사용하여 pH 6.8로 유지하였고, 발효 온도는 30 °C를 유지하였으며, 용존 산소는 saturation 상태의 40 %를 유지하기 위하여 발효기 내부의 impeller의 속도를 700 rpm까지 조절하였다.

3-4. Plasmid의 분리 및 형질 전환

Plasmid 유전자는 alkaline lysis 방법에 의해 분리하였으며[11], 균체내로의 형질 전환은 BioRad사의 Gene Pulser를 이용한 electroporation 기구를 사용하여 실시되었고, plasmid가 도입된 형질 전환체의 선별은 12.5 μ g/mL의 Tc가 첨가된 고체평판 배지에서 수행되었다. 형질전환을 위한 competent cell은 다음과 같은 방법으로 준비하였다.

균체를 일정한 성장 단계까지 배양한 후 3차 증류수로 2번 세척한다. 세척 후 얻어진 균체를 10 % glycerol 용액으로 세척한 후, 최종

흡광도(OD₆₀₀)가 120이 되도록 10% glycerol 용액을 이용하여 농축 세포 용액을 40 µL 씩 만들어서 사용 전까지 -70 °C에 보관한다.

3-5. Plasmid Vector의 안정성 측정

Plasmid의 instability는 structural instability와 segregational instability로 나눌 수 있다[12]. Structural instability는 plasmid의 일정 부분이 잘려나가는 것으로 재조합 균주의 배양 초기에 발생한다. Segregational instability는 재조합 균체가 분열하면서 plasmid가 분열된 균체로 이동하지 못하기 때문에 나타나는 것으로, 보통 재조합 균체의 배양에 있어서 segregational instability가 문제가 된다. Segregational instability 측정 방법은 다음과 같다.

재조합 *A. eutrophus*를 10 mL의 NB 배지를 갖는 test tube에서 계대 배양하였다. 흡광도 0.9까지 자란 균체들을 10 generation 이후 0.9가 되도록 적절한 부피로 새로운 NB 배지에 접종하였다. 이때 새로운 배지에 접종하기 전에 흡광도 0.9까지 자란 균체들을 NB와 Tc를 함유한 NB 고체배판 배지에 희석시켜 균체를 배양하였다. Segregational instability는 NB와 Tc를 가진 NB 고체배판 배지에서의 colony 수를 비교하여 확인하였다.

3-6. 분석

건조균체, P(3HB) 및 glucose 농도는 Lee 등[12]이 보고한 방법에 따라 측정하였다. P(3HB) 함량(P(3HB) content)은 건조 균체 농도에 대한 P(3HB) 농도의 백분율로 정의하였다. 잉여건조균체 농도(residual cell mass concentration)는 건조 균체 농도에서 P(3HB) 농도를 뺀 것으로 정의하였다. P(3HB) 합성속도(P(3HB) synthesis rate)는 단위 시간과 단위 잉여건조균체 농도에 대한 생산된 P(3HB) 양으로 정의하였다.

P(3HB) 생합성 관련 효소의 활성도 측정은 Lee 등[13]의 방법을 사용하여 β -ketothiolase와 acetoacetyl-CoA reductase에 대해서 측정하였다. 배양액으로부터 원심분리하여 얻어진 세포를 50 mM Tris · Cl(pH 8.1)와 protease inhibitor로 작용하는 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride를 가진 용액에 재현탁시킨다. 4 °C에서 sonication(Sonic and Materials 사)을 이용하여 세포를 파괴한 후, 5,000 × g로 10분간 원심분리하여 세포 여액을 얻었다. 이 여액을 이용하여 P(3HB) 생합성에 관계된 효소들 중에 β -ketothiolase와 acetoacetyl-CoA reductase의 활성도를 측정하였다. β -ketothiolase의 활성도는 thiolysis 반응에 의하여 측정하였으며, 반응혼합물은 세포 여액에 아래와 같은 반응물을 첨가하였다. CoenzymeA, 0.05 µmol; Acetoacetyl-CoA, 0.05 µmol; MgCl₂, 50 µmol; Tris · Cl(pH 8.1), 50 µmol.

Acetoacetyl-CoA reductase의 활성도 측정을 위해 첨가된 반응혼합물은, Potassium phosphate(pH 6.0), 50 µmol; Acetoacetyl-CoA, 50 µmol; NADPH, 0.1 µmol의 조성을 갖는다.

4. 결과 및 고찰

4-1. *Alcaligenes eutrophus* P(3HB) 생합성 유전자를 갖는 vector의 제작

재조합 균주의 개발을 위하여서는 형질 전환을 위한 vector의 제작이 먼저 요구된다. Vector는 기본적으로 형질 전환을 하기 위한 균주에서 복제능을 가지고 있어야 하며, 또한 형질 전환된 균주를 야생형 균주와 구별할 수 있게 하는 marker를 가지고 있어야 한다. 본 연구에서 사용하려는 *A. eutrophus*에 대해서는 이미 여러 유전자들의 cloning과 재조합 균주의 개발을 위하여 몇 가지 vector system이 개발되었다. Schubert 등[7]은 *A. eutrophus* H16에서 P(3HB) 생합성 유전자들을 cloning하기 위하여 broad-host-range plasmid인 pVK101을

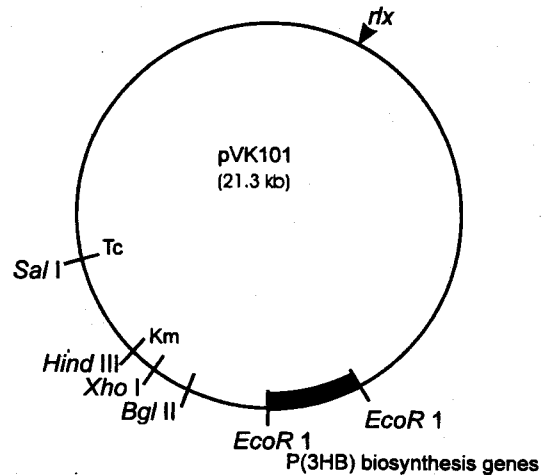


Fig. 1. Restriction map of a broad-host-range plasmid pVK101 containing the *A. eutrophus* P(3HB) biosynthesis genes.

사용하였다. Pries 등[14]도 재조합 *A. eutrophus* 균주의 개발을 위하여 pVK101을 이용한 vector system을 개발하였다. Plasmid pVK101은 Tc와 Km resistance 유전자를 가지는 plasmid로써 *A. eutrophus*, *Pseudomonas* 등의 여러 균주들의 형질 전환을 위하여 사용되었다.

본 연구에서는 이러한 pVK101을 이용하여 *A. eutrophus*의 P(3HB) 생합성 유전자를 갖는 vector system(pVK101-PHB)을 개발하였다. 확보된 pVK101을 복제능과 resistance 유전자들을 손상시키지 않고 제한효소 *EcoR* I으로 절단하였다. 그리고 이미 cloning된 *A. eutrophus*의 P(3HB) 생합성 유전자 부분을 *EcoR* I으로 양 끝을 절단하였다. 절단된 pVK101과 P(3HB) 생합성 유전자들의 부분을 결합하여 P(3HB) 생합성 유전자를 가지는 vector로 제작하였다. Fig. 1은 이러한 과정으로 제작된 pVK101-PHB를 나타낸다.

4-2. *Alcaligenes eutrophus*의 형질 전환

지금까지 알려진 *A. eutrophus*의 형질 전환 방법으로는 고체배판 배지에서 mating에 의한 conjugation 방법, calcium chloride에 의한 방법 등이 사용되어져 왔다. 하지만 이러한 방법들은 낮은 형질 전환 효율의 문제점을 가지고 있다. 최근 개발된 electroporation이라는 형질 전환 방법은 매우 높은 형질 전환 효율을 가지고 있으며, 대장균의 형질 전환의 경우에는 10⁹ transformant/µg 유전자의 높은 값이 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 이러한 높은 형질 전환 효율을 보이는 electroporation을 사용하여 *A. eutrophus*를 형질 전환하였다. Electroporation에 의한 *A. eutrophus*의 형질 전환에 관한 연구는 최근까지 없었기 때문에, 형질 전환에 영향을 끼치는 인자들, 즉 형질전환시 pulse의 strength, external resistance, competent cell의 성장 단계를 연구하였다. 형질 전환을 위한 유전자로는 재조합 *A. eutrophus* 제작을 위하여 개발된 P(3HB) 생합성 유전자들을 갖는 pVK101-PHB를 사용하였다.

Pulse의 strength, external resistance, capacity 등의 electroporation 조절 변수의 영향에 관한 실험에서 12.5 KV/cm voltage, 25 µF capacity, 그리고 200 Ω external resistance일 때 높은 형질 전환 효율을 얻을 수 있었다. Competent cell의 성장 단계에 따른 형질 전환 효율에 관한 실험에서 *A. eutrophus*가 대수 증식기인 OD₆₀₀에서 0.4의 값을 가질 경우 가장 높은 형질 전환 효율을 나타내었다. 이러한 조건이 최적화되었을 때 *A. eutrophus* P(3HB) 생합성 유전자들을 지닌 vector에 의한 형질 전환 효율은 10³ transformant/µg 유전자 값을 나타내었다.

4.3. 제작된 vector의 재조합 *Alcaligenes eutrophus* 내에서의 안정성

개발된 재조합 균주를 이용한 상업적 생산에서 vector의 안정성은 중요한 의미를 가진다. 일반적으로 형질 전환된 재조합 균주와 야생형 균주의 성장 속도를 비교할 때, 야생형 균주의 성장 속도가 빠르기 때문에 재조합 균주내의 vector가 안정성이 낮다면, 생물학적 생산과정(발효)에서 재조합 균주내의 vector가 없어진 야생형 균주만이 성장하게 되고, 원하는 생성물의 생산성이 낮아진다. 이를 방지하기 위하여 재조합 균주만이 resistance 유전자를 갖는 항생제를 첨가할 경우 항생제 사용에 따른 높은 생산 비용이 필요하게 된다[12]. 따라서 본 연구에서는 개발된 재조합 *A. eutrophus* 내의 vector의 안정성을 연구하였다. 재조합 *A. eutrophus*를 NB 배지에서 계대배양하여 확인한 plasmid의 segregational stability는 Fig. 2에 나타나 있다. 재조합 *A. eutrophus*를 80 generation까지 실험하였을 때 커다란 segregational instability는 나타나지 않았다. 80 generation 이후에 75%의 세포가 개발된 vector를 가지고 있는 것으로 나타났다. 하지만 재조합 *A. eutrophus*만의 세포 성장과 P(3HB) 합성능을 연구하기 위하여 재조합 *A. eutrophus*의 배양시 항상 항생제 Tc를 첨가하여 실험하였다.

4.4. 재조합 *Alcaligenes eutrophus*에 의한 P(3HB)의 합성

*A. eutrophus*는 과량의 탄소원 존재하에 질소원과 같은 영양분이 제한될 경우 P(3HB)를 합성·축적하기 때문에 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N)은 세포 성장과 P(3HB) 합성에 큰 영향을 끼친다. 야생형 *A. eutrophus*에 대해서, C/N의 몰비율이 낮을 경우 P(3HB)의 합성을 위해 요구되는 영양분 제한 조건은 세포성장이 많이 이루어진 이후에 일어나기 때문에 P(3HB)의 최종 농도와 P(3HB) 함량은 낮은 값을 가진다. 반대로 C/N의 비율이 너무 높을 경우에는 세포 성장 초반에 영양분 제한이 걸려서 P(3HB) 함량이 높아지지만, 영양분 제한하에서 세포 성장은 급격히 감소하기 때문에 세포 농도와 P(3HB) 농도는 낮은 값을 나타낸다. 따라서 적절한 C/N 몰비율에서 높은 세포 성장과 P(3HB) 농도가 얻어지게 된다. 이러한 C/N 몰비율의 영향을 개발된 재조합 *A. eutrophus*에 대해서 연구하였다. Fig. 3에 재조합 *A. eutrophus*를 R 배지에서 배양하였을 때 C/N 몰비율에 따른 세포 농도와 P(3HB) 농도를 나타내었다. R 배지에서 탄소원인 glucose의 농도를 20 g/L로 일정하게 유지하면서, 질소원의 농도를 변화시켜 실험하였다. C/N의 몰비율이 14.7로써 높을 경우 세포 농도와 P(3HB)의 농도는 가장 낮았으나, P(3HB) 함량은 66.05%로 가장

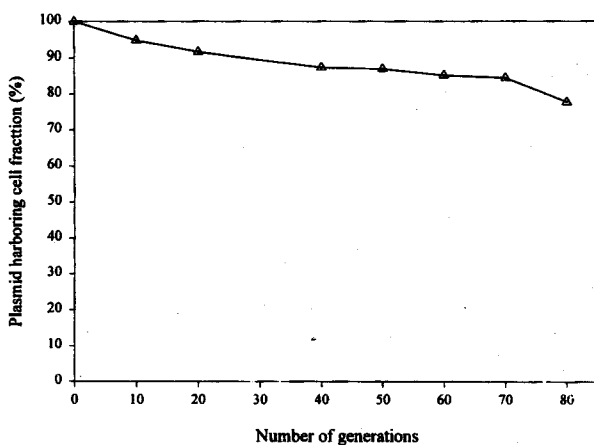


Fig. 2. Segregational stability of pVK101-PHB during the serial sub-culturing in NB medium without antibiotic supplement.

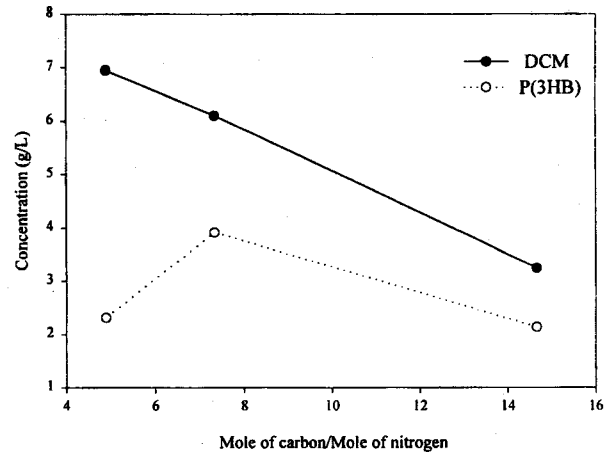


Fig. 3. Effect of carbon/nitrogen molar ratio on the P(3HB) production and cell growth of recombinant *A. eutrophus* in R medium containing 20 g/L of glucose.

높았다. C/N의 몰비율이 7.3일 때 P(3HB) 농도는 가장 높은 값(3.91 g/L)을 가졌다. C/N의 몰비율이 4.9로써 가장 낮은 값을 가질 경우에는 세포 농도가 6.95 g/L로 가장 높은 값을 가졌지만, 2.32 g/L의 P(3HB) 농도, 그리고 33.38%의 가장 낮은 P(3HB) 함량을 가졌다.

위의 실험결과에서 알 수 있듯이 P(3HB) 생합성 유전자를 가진 vector로서 형질 전환된 재조합 *A. eutrophus*의 경우도 야생형 *A. eutrophus*와 같은 경향을 보이고 있다. 즉 C/N 몰비율이 증가할수록 P(3HB)의 함량은 증가하지만 최종적으로 얻어지는 세포 농도와 P(3HB)의 농도는 낮은 값을 가지며, C/N의 몰비율이 낮을 경우에는 비록 높은 세포 농도를 얻을 수 있지만 낮은 P(3HB)의 농도를 가지게 된다. 적절한 C/N의 몰비율이 실험에서 7.3일 때에서 가장 높은 P(3HB) 농도를 얻을 수 있었다.

탄소원 glucose의 농도에 따른 재조합 *A. eutrophus*의 세포 성장과 P(3HB) 합성능을 연구하였다. C/N 몰비율은 7.3으로 일정하게 유지시키면서, glucose의 농도를 5 g, 10 g, 20 g으로 변화시켜 flask 배양한 결과 세포 농도와 P(3HB) 농도가 Fig. 4와 같은 결과를 보였다. 탄소원의 농도가 20 g/L일 때 세포 농도와 P(3HB) 농도가 가장 높은 값을 나타내었다. Glucose의 농도가 30 g/L 이상일 경우 높은 농도의 기질에 의한 inhibition effect로 인해 재조합 *A. eutrophus*의 성장이 저해되는 것이 관측되었다.

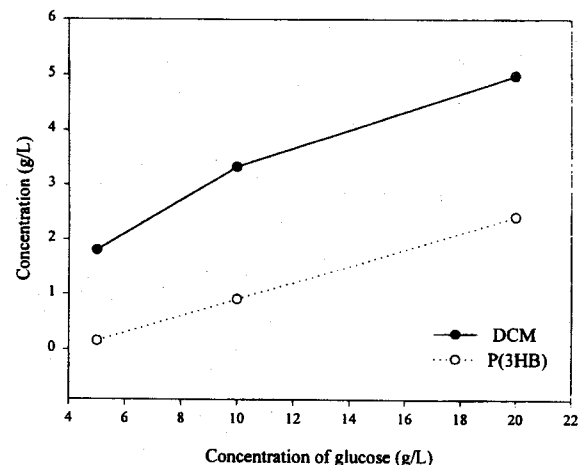


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the P(3HB) production and cell growth of recombinant *A. eutrophus* in R medium.

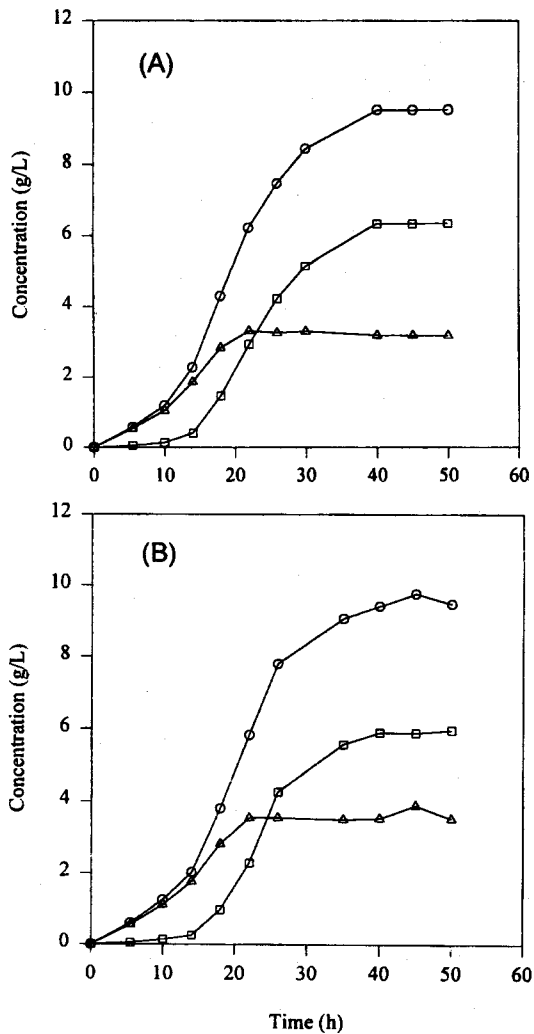


Fig. 5. Batch cultivation of (A) recombinant and (B) wild type *A. eutrophus* in R medium containing 20 g/L of glucose.

(○ dry cell concentration, □ P(3HB) concentration, △ residual cell concentration).

4-5. 재조합 *Alcaligenes eutrophus*와 야생형 *Alcaligenes eutrophus*의 P(3HB) 합성능 비교

본 연구에서 제작된 재조합 *A. eutrophus*와 야생형 *A. eutrophus*의 세포 성장과 P(3HB) 합성능을 비교하기 위하여 발효기내에서의 회분식 배양을 실험하였다. R medium에서 glucose 농도를 20 g/L로 하였을 때, 시간에 따른 세포 농도와 P(3HB) 농도는 Fig. 5와 같다. 최종 세포 농도와 P(3HB) 농도는 재조합 *A. eutrophus*의 경우 9.5 g/L의 세포 농도, 6.35 g/L의 P(3HB)를 나타내었고, 야생형 *A. eutrophus*의 경우 9.5 g/L의 세포 농도와 6 g/L의 P(3HB)의 농도를 나타내었다. 최종 세포 농도에 대해서는 재조합 *A. eutrophus*와 야생형 *A. eutrophus*가 거의 같은 농도를 보였고, P(3HB)의 농도는 재조합 *A. eutrophus*가 wild type보다 약간 높은 값을 가졌다. 잔여 세포 농도는 재조합 균주에서 더 낮은 값을 가졌다. 시간에 따른 이 두 균주들의 P(3HB) 함량을 Fig. 6에 나타내었다. 재조합 *A. eutrophus*가 야생형 *A. eutrophus*보다 높은 P(3HB) 함량을 가지고 있는 것으로 나타났다. Fig. 7에 이들 두 균주들의 P(3HB) 합성속도를 비교하였다. 전체적으로 볼 때 재조합 *A. eutrophus*가 야생형보다 높은 합성속도를 가지고 있다. 또한 회분식 배양에서 재조합 *A. eutrophus*와 야생

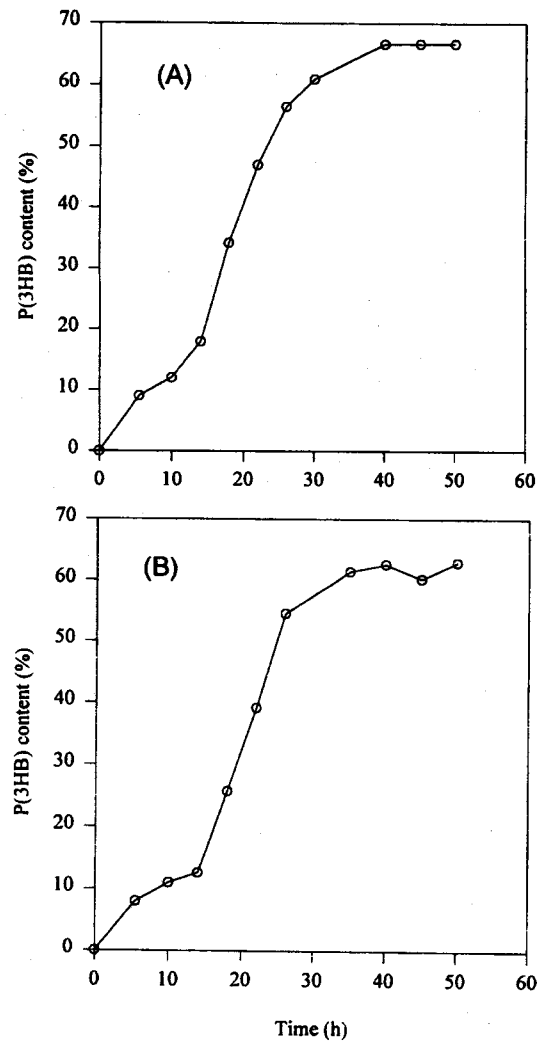


Fig. 6. Time profile of P(3HB) content of (A) recombinant and (B) wild type *A. eutrophus* during cultivation described in Fig. 5.

형 균주에 대해 시간에 따른 P(3HB) 생합성 관련 효소인 β -ketothiolase와 acetoacetyl-CoA reductase의 효소 활성도를 측정된 결과 재조합 *A. eutrophus*에서의 효소 활성도가 2배 이상 증가하였다(data not shown).

이러한 결과는 모두 재연성 실험을 통하여 유사한 결과가 확인되었다. *A. eutrophus*내의 P(3HB) 생합성 대사회로에서 세 개의 관련 효소들, β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, 그리고 P(3HB) synthase의 활성도를 증가시킬 경우 P(3HB)의 생합성능이 증가할 것으로 기대하였다. 하지만 연구 결과 관련 효소들의 활성도는 2배 증가하였지만, 최종적으로 얻어진 P(3HB) 농도는 5.8% 증가하였고, P(3HB) 합성속도는 최대 20% 증가만을 보였다. 이러한 결과는 관련 효소의 활성도가 2배 이상 증가하였지만, P(3HB) 생합성 대사회로에 증가한 효소 활성도가 큰 영향을 미치지 못하였기 때문이다. 본 실험에서 vector 제작에 사용된 pVK101은 broad-host-range plasmid로써 낮은 복제수(-10 복제수)를 가지고 있기 때문에, 결합되어져 있는 P(3HB) 생합성 관련 효소들의 많은 발현은 기대하기 어렵다. 최근 Park 등[15]도 이와 유사한 재조합 *A. eutrophus*에 관한 연구 결과를 발표하였다. 만약 높은 복제수를 가진 vector의 제작이 가능하다면, P(3HB) 생합성 효소들의 높은 활성도 증가와 P(3HB) 합성능의 뚜렷한 증가가 보일 것으로 기대된다.

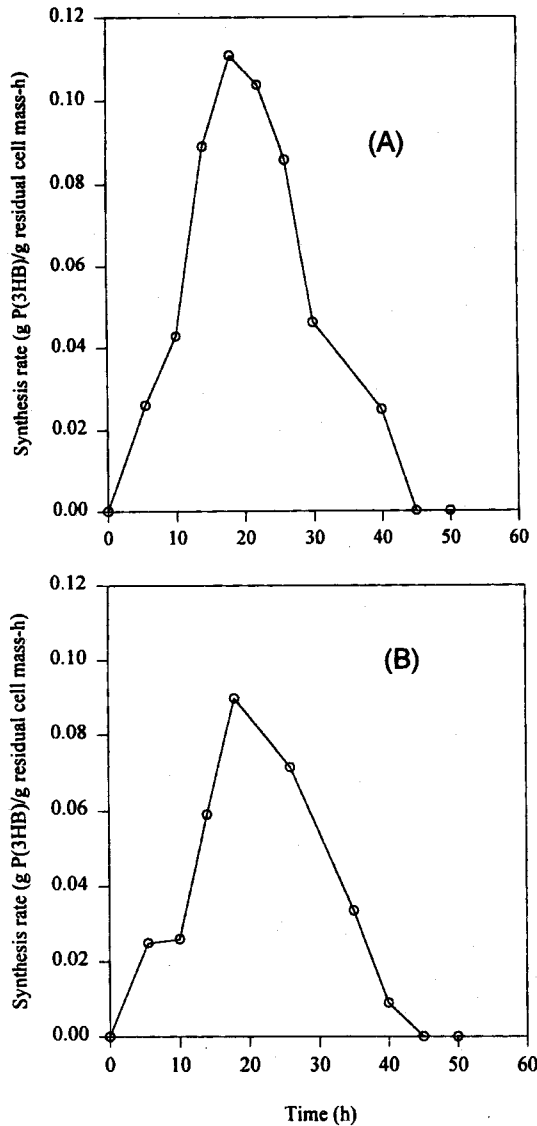


Fig. 7. Time profile of P(3HB) synthesis rate of (A) recombinant and (B) wild type *A. eutrophus* during cultivation described in Fig. 5.

5. 결 론

본 과제에서는 P(3HB) 생합성 유전자를 가진 vector로 형질 전환된 재조합 *A. eutrophus*의 P(3HB) 생합성능을 연구하였다. 재조합 *A. eutrophus*의 제작을 위하여 먼저 요구되는 vector 시스템은 broad-host-range plasmid pVK101을 이용하여 제작하였고, 형질 전환 기술로써 electroporation을 이용하여 10^3 transformant/ μ g 유전자의 높은 형질 전환 효율을 얻었다.

이러한 방법으로 제작된 재조합 *A. eutrophus*내의 plasmid stability를 측정하여 cell이 80 generation까지 배양되었을 때 75 % 이상

이 plasmid를 함유하고 있다는 실험결과를 얻었다.

재조합 *A. eutrophus*의 P(3HB) 합성능을 연구하여 야생형 *A. eutrophus*와 같이 높은 C/N 몰비율에서는 낮은 세포 성장과 P(3HB) 농도를, 낮은 C/N 몰비율에서는 낮은 P(3HB) 함량을 나타내는 것을 밝혔다.

발효기를 이용한 회분식 배양에서 재조합 *A. eutrophus*와 야생형 *A. eutrophus*의 P(3HB) 합성능을 비교하여, 재조합 균주의 경우 야생형보다 높은 최종 P(3HB) 농도와 P(3HB) 함량을 가졌으며 합성 속도에서는 20 % 이상의 증가를 보였다. 또한 P(3HB) 생합성 관련 효소들(β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase)의 활성도를 측정 한 결과 재조합 *A. eutrophus*의 경우가 야생형 균주보다 2배 이상의 증가를 보였다. 개발된 재조합 *A. eutrophus*에 대해서 아주 높은 P(3HB) 합성능 향상은 관찰되지 않았지만, 이것은 vector 제작에 사용된 낮은 복제수의 plasmid에 의한 것으로 만약 높은 복제수를 갖는 vector의 제작이 가능하다면 높은 P(3HB) 합성능 향상을 가진 재조합 균주가 기대된다.

감 사

이 논문은 1995년도 교육부 생물화공 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Doi, Y.: "Microbial Polyesters", VCH, New York(1990).
- Lee, S. Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 1(1996).
- Lee, S. Y.: *Trends Biotechnol.*, **14**, 431(1996).
- Holmes, P. A.: In "Developments in Crystalline Polymers", Elsevier, London, **2**, 1(1988).
- Steinbuechel, A.: In "Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources", Stockton, NY, 124(1991).
- Peoples, O. P. and Sinskey, A. J.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 15298(1989).
- Schubert, P., Steinbuechel, A. and Schlegel, H. G.: *J. Bacteriol.*, **170**, 5837(1988).
- Slater, S. C., Voige, W. H. and Dennis, D. E.: *J. Bacteriol.*, **170**, 4431(1988).
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K. and Woo, S. I.: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 892(1994).
- Knauf, V. C. and Nester, E. W.: *Plasmid*, **8**, 45(1982).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY(1989).
- Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N. and Chang, Y. K.: *J. Biotechnol.*, **32**, 203(1994).
- Lee, I. Y., Kim, M. K., Park, Y. H. and Lee, S. Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 707(1996).
- Pries, A., Steinbuechel, A. and Schlegel, H. G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 410(1990).
- Park, J. -S., Park, H. -C., Huh, T. -L. and Lee, H. -H.: *Biotechnol. Lett.*, **17**, 735(1995).