

BSE71610-586-3

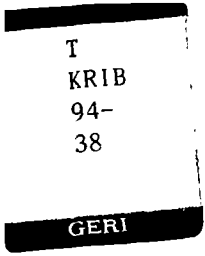
# 대사공학적으로 변환된 미생물의 생리 연구

Physiological Studies of Metabolically Engineered  
Microbes

연구 기관  
한국과학기술연구원  
부설유전공학연구소

과 학 기 술 처





제 출 문

한국과학기술연구원  
유전공학연구소장 귀하

본 보고서를 1993년도 기본과제로 수행한 “대사공학적으로 변환된 재조합 미생물의 생리 연구”의 최종 보고서로 제출합니다.

1994년 2월

연구기관 : 한국과학기술연구원 유전공학연구소  
연구책임자 : 반재구 (유전공학연구소 선임연구원)  
연구원 : 박영훈 (유전공학연구소 책임연구원)  
          정홍채 (유전공학연구소 연구원)  
          함대현 (유전공학연구소 연구원)  
          장동은 (유전공학연구소 연구원)  
          박준현 (유전공학연구소 연구원)



## 요 약 문

### I. 제목

대사공학적으로 변환된 재조합 미생물의 생리 연구

### II. 연구의 목적 및 중요성

일반적인 유전공학 기술과 산업 균주에 관한 유전자 조작 기술이 발달함에 따라 대사공학적으로 변환된 다양한 미생물의 출현이 예고되고 있다. 이러한 재조합 미생물들은 외래단백질 생산을 위해 만들어진 유전공학 초기의 재조합 균주와는 다른 것으로 정확한 생리 상태 분석을 필요로 하게 된다. 외래 단백질 생산을 위한 재조합 균주에 비해서 대사 조절을 위해 만들어진 재조합 미생물에서의 생리 및 대사변화 연구는 중요한 의미를 갖는다. 대사 조절된 재조합 변이주를 만드는 이유는 생물공정 디자인시의 제한요소를 극복하기 위한 것과 외래대사산물을 생산하고자 하는 것, 두가지 목적으로 크게 나눌 수 있다.

생물공정의 효율적인 운영을 위해서는 산소 및 기질 이용효율을 향상시킨다든지 발열량을 줄인다든지, 성장속도를 빠르게 한다든지 등의 결과를 기대하는 대사공학적 변환이 가능하다. 두번째로 외래 대사산물을 생산하고자하는 시도는 외래 단백질을 배양하기 쉬운 host 에 옮겨서 생산하고자 하는 초기의 유전공학의 목적과 같은 것이다. 즉, 현재 다른 산업 미생물에서 생산되고 있으나 생산속도, 수율, 농도, 발효기질의 범위 등 발효에서의 경제성을 결정하는 여러 최적화 변수들을 새로운 host 에 옮김으로써 향상시킬 수 있는 경우에 해당한다. 어려운 일로 보이지만 적절한 host 의 선택과 대사공학적으로 변환된 미생물의 대사 및 생리 분석이 정확히 이루어진다면 많은 대사산물을 생산하는 새로운 host 들이 생겨날 것이다.

### III. 연구의 내용 및 범위

대장균의 대사 분석

by-product(-) host 의 제조

metabolic flux 변화를 위한 유전자의 도입

대사 조절 및 생리 연구

미생물의 배양공학

### IV. 연구 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 연구 결과 및 고찰

대장균의 대사분석의 결과 초산이 생산되는 대사분기점인 acetyl-CoA 에서는 에탄올이 함께 생산되고 있는 반응으로서 초산생산을 유전학적으로 제거 하면 에탄올을 비롯한 포름산이 동시에 생산되지 않았다. 세포증식을 위해 필요한 에너지(ATP, NADH)를 얻고 남은 탄소골격은 D-젓산으로 secretion 되었다. 이는 해당과정에서 생산된 NADH를 산화시키기 위해 이뤄지므로 대장균 내의 metabolic flux 가 세포증식을 위해 변화됨을 알 수 있었다. 젓산균 유래의 L-LDH 유전자를 초산생산이 결핍된 대장균에 도입하여 metabolic flux 를 관찰하였을 때는 기대되었던 L-젓산의 축적은 거의 없었고 대부분 D-젓산이었다. 따라서 대장균에서 L-젓산을 생산하고자 하면 대장균 자체의 D-LDH가 결핍된 변이주를 사용하는 것이 유리할 것이다. 절대 호기성균인 고초균의 경우는 소량의 L-젓산을 생산하지만 좀 더 자세한 대사분석이 필요한 부분이다.

## 2. 연구 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 대사조절이 변화된 대장균의 생리연구를 통하여 외래 대사산물을 생산할 수 있음을 밝혔다. 이와 같이 가장 많이 연구가 된 대장균과 고초균의 생리상태를 더 자세히 연구한다면 대사조절이 많이 변화된 경우도 쉽게 외래 대사 산물을 생산할 수 있는 host 로 사용가능할 것이다.

## Summary

### I. Title

Physiological studies of metabolically engineered microbes

### II. Objectives and Importance of the Research

A variety of microbes that metabolically engineered would be appeared according to the improvement of gene manipulation technologies. Although recombinant microorganisms were initially used for production of foreign protein, recently they are also used for production of metabolites, e.g. ethanol, amino acids, PHB, vitamins, etc. Therefore it is necessary to investigate the physiological states of recombinant microbes. Metabolically manipulated microbes would be utilized for overcoming the problems of bioprocess optimization, and also for production of metabolites.

### III. Contents and scope of the research

- Metabolic analysis of *Escherichia coli*
- Construction of by-product (-)
- Introduction of foreign gene to change the metabolic flux
- Studies of metabolic regulation and physiology
- Cultivation technology of microorganisms



## Contents

### *Physiological Studies of Metabolically Engineered Microbes*

1. Introduction	1
1.1 General remarks	1
1.2 Physiological studies of recombinants	1
1.3 Metabolite production	2
2. Materials and Methods	3
2.1 Microorganisms	3
2.2 Media	4
2.3 Fermentation methods	4
2.4 Analytical methods	5
2.5 Construction of plasmid	5
2.6 Construction of <i>pta</i> mutant	5
3. Results and Discussion	11
3.1 Metabolic analysis of <i>E. coli</i>	11
3.2 Metabolic analysis of <i>pta</i> mutant	11
3.3 Process of <i>pta</i> mutant	14
3.4 Process of various acetate (-) mutant	16
3.5 High production of D-lactate	19
3.6 Introduction of L-LDH gene in <i>E. coli</i>	19
4. Conclusions and Perspectives	27
5. References	28



## 목 차

제 1 장 서론	
제 1 절 개 요	1
제 2 절 재조합 대장균과 고초균의 생리 연구	1
제 3 절 재조합균을 이용한 외래 대사산물의 생산	2
제 2 장 재료 및 방법	
제 1 절 사용균주 및 보관	3
제 2 절 사용배지 및 시약	4
제 3 절 배양 방법	4
제 4 절 분석 방법	5
제 5 절 플라스미드 제조방법	5
제 6 절 초산생산 결핍균의 제조방법	5
제 3 장 결과 및 고찰	
제 1 절 대장균의 대사분석	11
제 2 절 초산생산결핍 대장균의 대사분석	11
제 3 절 초산생산결핍 대장균의 발효공정	14
제 4 절 다양한 초산 결핍 대장균의 대사분석	16
제 5 절 초산 생산결핍균을 이용한 D-젖산의 대량생산	19
제 6 절 L-LDH를 이용한 발효경로의 대사공학	19
제 4 장 결론 및 전망	27
제 5 장 참고 문헌	28



## 제 1 장 서 론

### 제 1 절 개 요

일반적인 유전공학 기술과 산업 균주에 관한 유전자 조작 기술이 발달함에 따라 대사공학적으로 변환된 다양한 지조합 미생물들의 출현이 예고되고 있다. 이러한 재조합 미생물들은 외래 단백질 생산을 위해 만들어진 유전공학 초기의 지조합 균주와는 다른 것으로 정확한 생리 상태(Physiological state)분석을 필요로 하게 된다. 외래단백질 생산을 위한 재조합 균주에 비해서 대사 조절을 위해 만들어지는 재조합 미생물에서의 생리 및 대사변화 연구는 중요한 의미를 갖는다는 것이다. 대사조절된 재조합 변이주를 만드는 이유는 생물공정 디자인시의 제한요소를 극복하기 위한 것과 외래 대사산물을 생산하고자 하는 것, 두가지 목적으로 크게 나눌 수 있다.

### 제 2 절 재조합 대장균과 고초균의 생리 연구

대장균을 고초균과 함께 재조합균으로써 가장 많이 사용되고 있는 세균이다. 따라서 이 두가지 재조합균의 생리 상태 연구는 차후 출현하게 될 재조합균의 생물공정 디자인이나 균주 자체의 디자인시 중요한 가이드가 될 것이다. 재조합 대장균의 생리 연구는 생물공정면에서 고농도 배양, 초산 생산의 제한, 대사활성 및 생리상태의 인공지능적 제어등이 주된 공정의 최적화에 사용된 기술들이었다. 그러나 대부분의 공정에서의 문제점은 대장균이 초산을 세포밖으로 대량 축적함으로써 야기한 문제점이다. 따라서 최적화의 목적도 초산생산억제가 목표가 되었다.

본 연구에서도 초산생산을 근본적으로 제한하고 고농도 배양과 세포내의 metabolic flux의 변화로 야기된 대사를 분석함으로써 재조합 대장균의 생리 상태를 연구하였다. metabolic flux의 변화를 위하여 이미 cloning된 젓산균유래의 L-Lactate Dehydrogenase 유전자를 도입하여 대장균의 central pathway에 관련된 metabolic flux의 변화를 관찰하였다. 이미 대장균에서 ethanol을 생산하는 것이 특허로 등록되어 있고 산업적으로 타당성이 검토되고 있다고 하니 이러한 일이 멀리 있는 것만은 아닌것 같다.

### 제 3 절 재조합균을 이용한 외래 대사산물의 생산

현재 재조합 대장균을 이용하여 생산하고 있는 대사산물은 Threonine을 비롯한 아미노산류를 국내의 (주)미원, (주)제일제당 그리고 프랑스의 Eurolysine사에서 생산하고 있고, Ethanol 과 PHB 등을 재조합 대장균을 이용한 공정은 특허와 함께 생산을 시도하고 있다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 제 1 절 사용균주 및 보관

본 연구에 사용된 균주와 플라스미드는 표1에 나타내었다. 모든 균주는 LB 배지에서 배양하여 20% 글리세롤 Stock를 만들어 영하 70도씨에 보관하였고 필요에 따라 LB 한천 배지에 도말하여 37도씨에서 하룻밤 배양한 후 4도씨 냉장보관하여 2 주 마다 계대하여 사용하였다.

Table 1. 사용된 균주 및 플라스미드

<i>Escherichia coli</i>	HB101	
	RR1	
	RR1 <i>pta</i>	
	RR1 <i>pta</i> 101	
	RR1 <i>pta</i> 102	
	RR1 <i>pta</i> ::Tn10-lacZ	
	RR1 <i>ackA</i> -101	
	RR1 <i>ackA</i> -102	
	RR1 $\Delta$ <i>ackA</i> -2	
	EJ500	
<i>Bacillus subtilis</i>	IS75	
Plasmid	pUC19	
	pLS65	Ap <sup>r</sup> LDH gene
	pDR69	Ap <sup>r</sup> cat Amylase gene
	pJDH10	Ap <sup>r</sup> cat Amylase LDH

## 제 2 절 사용배지 및 시약

본 연구에 사용된 배지는 LB 배지(Bacto-Tryptone 10g/L, Bacto-Yeast Extract 5g/L, NaCl 5g/L, pH=7.2-7.4)를 사용하였고 필요에 따라 Ampicillin (50mg/L) 와 Tetracycline (15mg/L) 를 사용하여 플라스미드를 갖지 않은 세포의 성장을 막았다.

실험에 사용한 모든 시약들은 Reagent grade 를 사용하였으며 Sigma 사 와 Junsei 사에서 구입하였다. 분자생물학적인 실험은 Sigma 사의 분자생물학 수준의 고순도 시약을 구입하여 사용하였다.

## 제 3 절 배양 방법

종균은 모두 LB 한천 배지에서 유지 보관하였고 각종 플라스미드를 갖는 재조합 대장균의 배양은 LB 한천배지에 자란 colony의 한 백금을 LB 배지로 접종하여 37 도씨에서 하룻밤 배양하였다. 유전자 조작에 필요한 배양방법 및 조작은 Maniatis 의 Molecular cloning 책을 참고하였다. 회분배양 및 유가식 배양은 모두 5L jar fermentor (한국 발효기(주))을 사용하였으며 조작부피는 3L를 사용하였다. 배양은 시작은 계대배양 중인 종균 한 백금을 50mL 의 LB배지를 함유한 500mL Baffled flask 에 접종한 후 37 도씨 , 150 rpm으로 고정된 진탕회전 배양기에서 12-15 시간 배양하였다. 배양이 끝난 종균은 접종량이 최종 3-5% (V/V) 가 되도록 접종하였다. 교반과 통기속도는 배양중에 호기적인 상태를 유지하기 위해 각각 100-1400rpm , 0.5-2.0vvm사이의 변화를 주면서 조절하였다. 혐기적 배양을



위해서는 질소가스를 불어넣어 혐기적 조건을 유지하였다.

#### 제 4 절 분석방법

대장균의 성장은 배지의 흡광도(Spectronic 21, Basch & Lomb Co., USA)를 측정함으로써 추적하였다. 배지내 잔존하는 포도당의 농도는 Glucose/L-Lactate analyzer (2300STAT, YSI Co., USA)를 사용하여 측정하였으며 발효부산물은 HPLC(Organic acid 전용 column TSK-GEL, ODS-120T, TOSOH Co., Japen) 을 이용하여 측정하였고 효소적방법 (Testkit, Beohringer Mannheim, Germany)으로 확인하여 보정하였다.

#### 제 5 절 플라스미드 제조

젖산균 *Lactobacillus casei* 로부터 클로닝한 L-Lactate Dehydrogenase (L-LDH) 유전자를 갖는 플라스미드, pLS65 는 Fig. 1에 보였다. pLS65 는 젖산균으로부터 chromosome 를 분리하여 EcoRI 과 BamHI 으로 절단한 다음 대장균 벡터 pUC19 의 EcoRI 과 BamHI site 부분에 subcloning 한 것이다. 대장균에서의 발현은 pLS65를 사용하여 해당계에 관련된 Flux를 변화 시켰다. L-LDH를 고초균에 발현시키기 위해 대장균과 고초균의 shuttle vector 인 pDR69를 사용하여 L-LDH 유전자를 pLS65로부터 subcloning 하였다(Fig.2). 구체적인 과정을 Fig.3 에 보였다.

#### 제 6 절 초산 생산 결핍 대장균의 제조

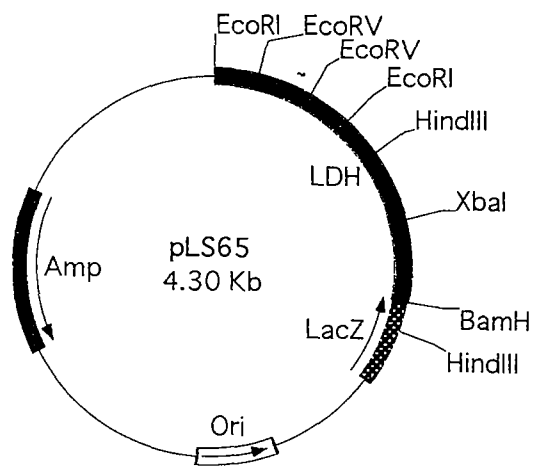


Fig.1 Restriction map of pLS65

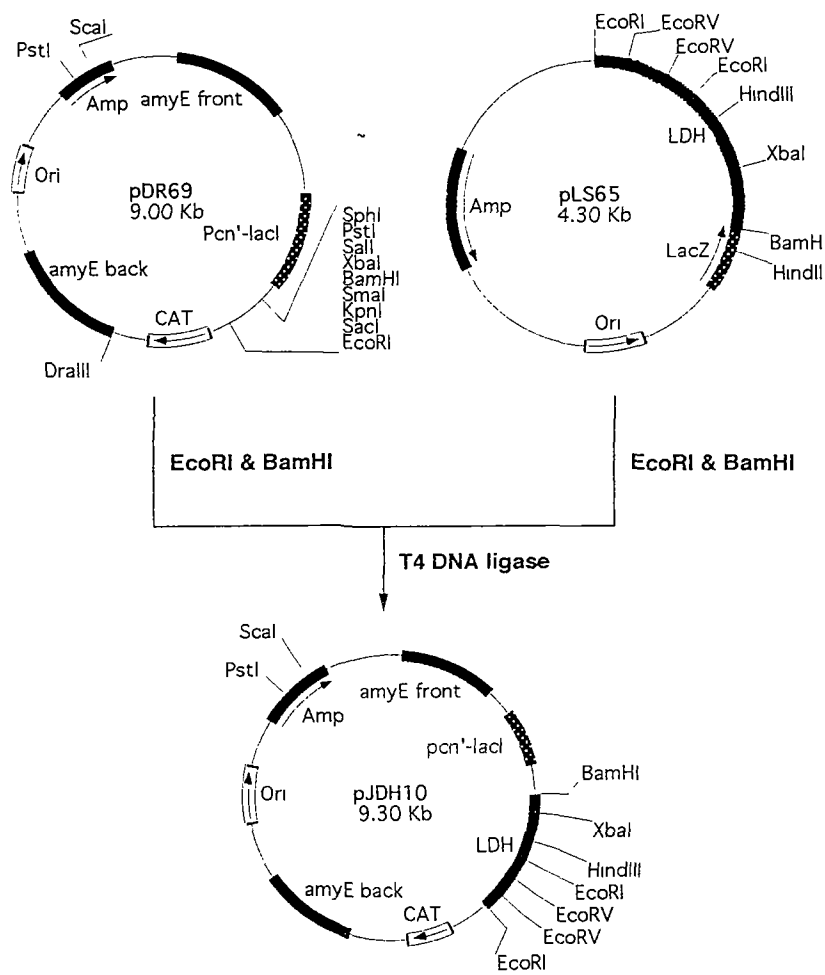


Fig.2 Restriction map and construction scheme of plasmid construction of pJDH10.

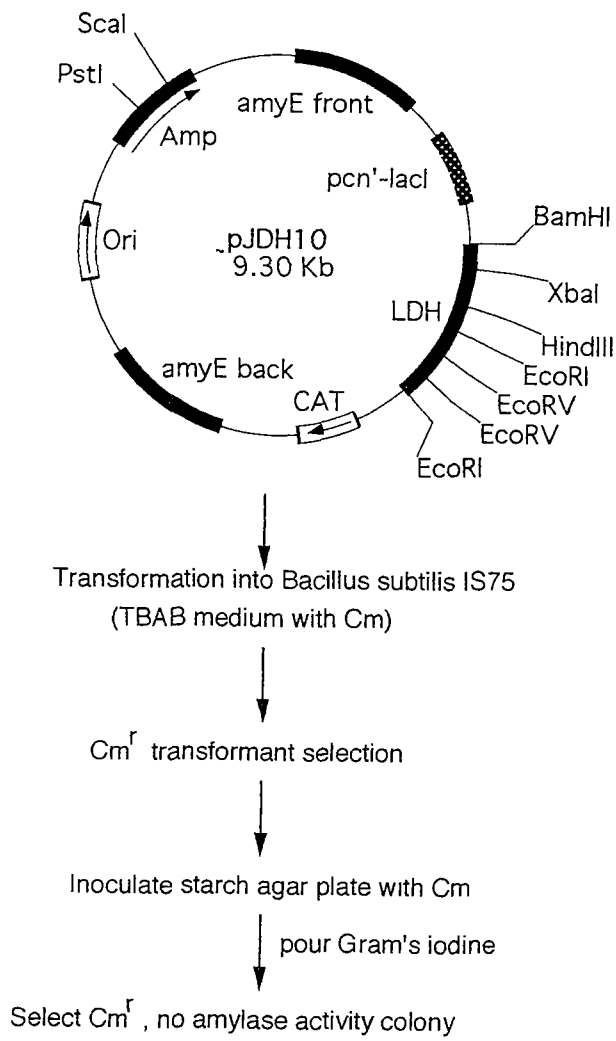


Fig.3 Schematic diagram for expression of L-LHD into *Bacillus*

대장균 RR1 를 이용하여 초산생산이 결핍된 변이주, 대장균 RR1/*pta*<sup>-</sup> 를 제조하였다. 대장균에서 초산생산은 Acetyl-CoA를 acetyl-phosphate 로 전환시키는 phosphotransacetylase(*pta* )와 다시 acetyl-phosphate 를 acetate 로 전환시키는 효소 acetate kinase(*ack* )를 이용하는 소위 PTA-ACK Pathway 이다. 본 연구에서는 경우에 따라 *pta* 를 유전적으로 block시키거나 *ack* 를 유전적으로 block 시켜 초산생산을 없앴다.



### 제 3 장 결과 및 고찰

#### 제 1 절 대장균의 대사분석

모든 생물체의 대사결과는 자신의 증식에 있다. 대장균이 포도당과 같은 당류를 대사기질로 사용하여 호기적으로 증식할 경우 해당과정과 TCA cycle 에서 생산된 NADH를 전자전달계에서 산화되지만 혐기적으로 증식할 경우 중간 대사산물이 최종전자수용체로 사용되는 소위 발효(fermentation)를 거쳐 필요한 대사에너지와 탄소골격을 얻는다. 따라서 혐기발효의 대사는 얼마나 빨리 해당과정에서 생긴 NADH를 산화시키는데 있다. 대장균은 NADH의 산화를 위해 D-젖산, 에탄올과 소량의 숙신산을 적당한 비율로 생산하며 대사적 균형(Metabolic balance)을 이룬다. Fig.4 는 대장균의 Central Pathway 를 발효산물을 중심으로 그린 것이다. 현재까지 알려진 혐기적 대사는 Fig.5 에 보인 것처럼 pH중성, 온도 37 °C 에서 포름산 : 초산 : 에탄올 이 2:1:1 의 비율로 세포밖으로 secretion 하면서 대사균형을 이룬다. 대장균의 여러 가지 균주 및 배양조건에 따라 그 균형은 약간씩 변하지만 pH가 약산성일 경우 D-젖산을 secretion 하는 것과 대사기질의 종류에 따라 변하는 것외에는 크게 다르지 않다.

#### 제 2 절 초산 생산 결핍 대장균의 대사분석

초산은 대장균의 대사 부산물중 그 양이 많고 재조합 대장균을 포함한 산업균주의 증식을 저해할 뿐 아니라 재조합 단백질의 생산 자체를 저해하여

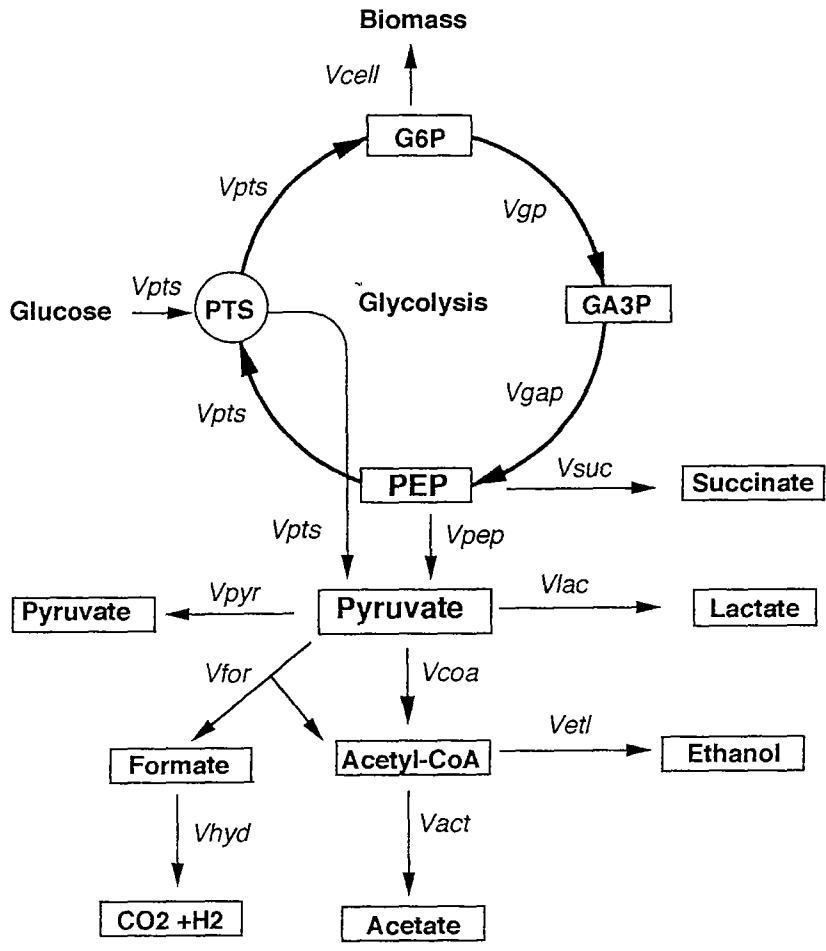


Fig.4 Coordinated central metabolism of anaerobic growth of *Escherichia coli*. V means metabolic flux calculated by balance equation.



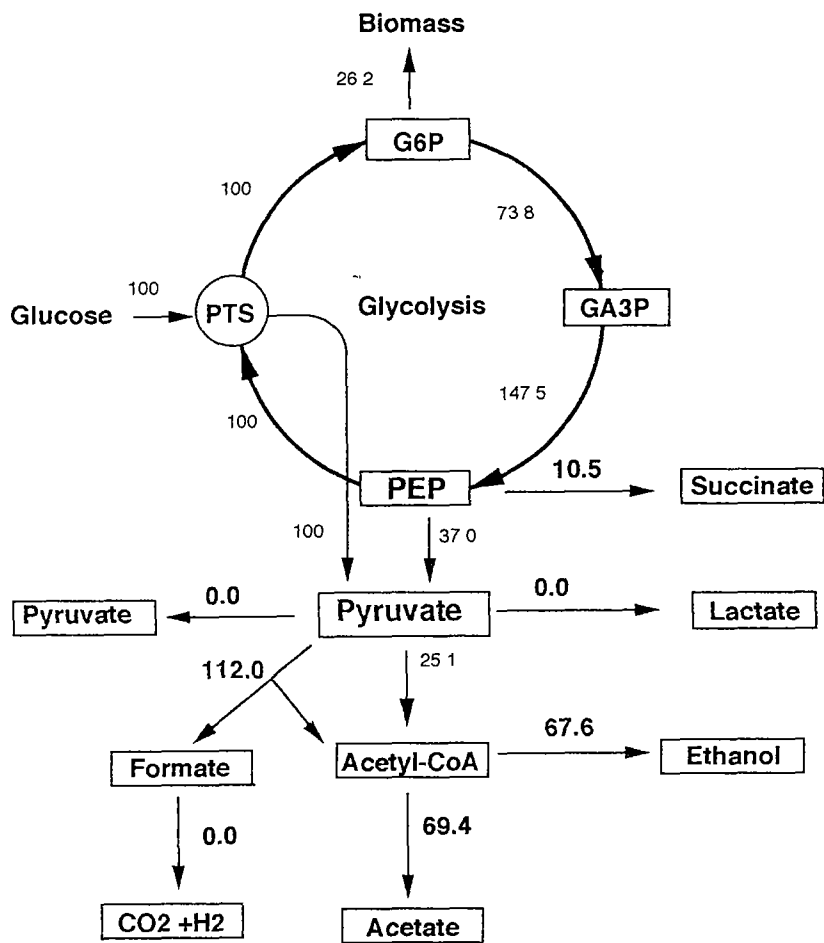


Fig.5 Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in anaerobic culture. All bold values are measured and the others are calculated from balance equation.

고농도 배양 및 생산물의 발효공정에 크게 영향을 끼친다. 또한 발효과정중에 축적된 초산이 세포내의 pH 를 낮춰 세포가 소위 stationary phase response 를 보임을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 유전학적으로 초산 생산에 관여하는 효소의 유전자를 Block 하여 초산 생산을 근본적으로 없앤 균주를 제조하였다. 실제 혐기적 배양의 대사를 분석한 결과를 Fig.6 에 보였다. 데이타로부터 알 수 있듯이 초산생산을 없애면 상기한 포름산 : 초산 : 에탄올 의 대사 균형이 깨져 세가지 대사산물이 거의 생산되지 않았다. 따라서 해당과정에서 축적된 거의 모든 피루브산과 NADH는 D-젖산을 생산하는데 사용되고 남은 피루브산은 세포밖으로 secretion됨을 알수 있었다. 대장균이 D-젖산을 생산하기 위해서는 세포내 피루브산농도가 높아지거나 세포의 pH가 낮아져 fermentative D-Lactate Dehydrogenase의 활성이 증가하여야만 된다. NADH 의 산화를 위해 숙신산을 생산하는데 사용될 것처럼 보이지만 대장균은 이러한 기작은 가지고 있지 않다. 이는 더 자세한 분자생물학적 정보가 필요함을 알 수 있다.

### 제 3 절 초산 생산 결핍 대장균의 공정

초산 생산은 대장균과 재조합 대장균의 고농도 배양에 가장 큰 장애물이 되어왔고 대장균을 이용한 발효공정의 생산성을 낮추는 주요요인이다. 이를 해결하기 위해 dialysis를 이용한 초산의 제거, 세포의 재순환을 통한 초산의 제거등 물리적 방법과 배양액에 존재하는 기질농도를 다양한 방법 - 발효과정의 인공지능적 생리상태의 추정에 의한 조절, 기질농도의 on-line측정에 의한 feed-back 조절 등 - 으로 낮춰 Glucose effect 를 낮추는 생리적 방법등

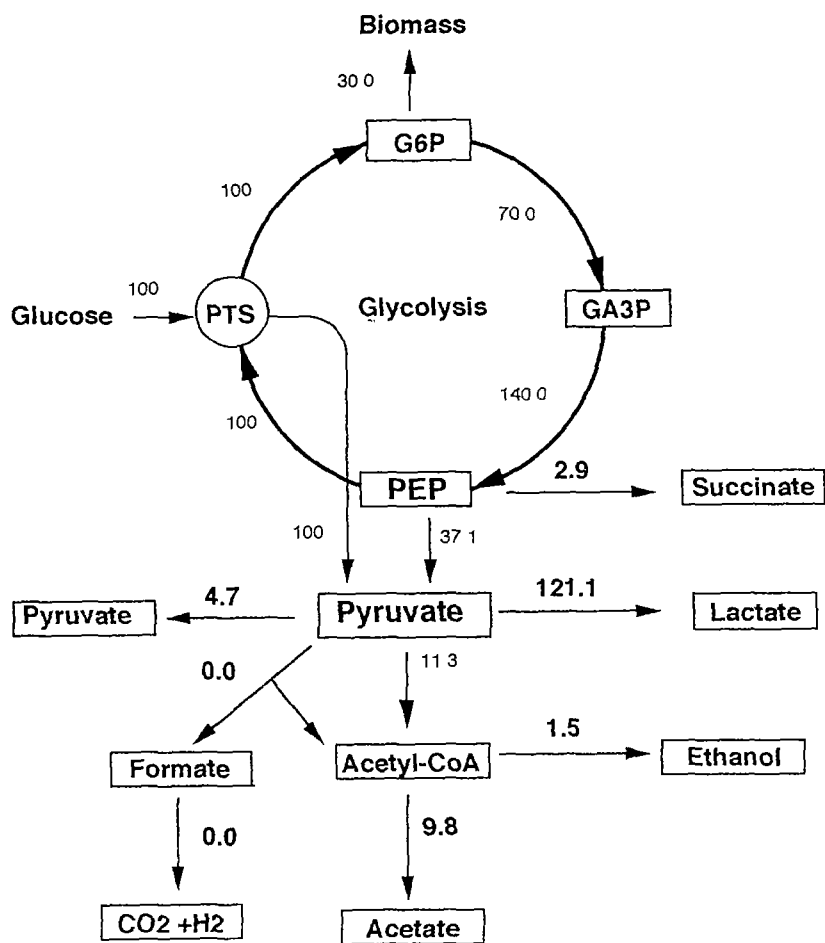


Fig.6 Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* pta mutant in anaerobic culture. All bold values are measured and the others are calculated from balance equation.

다양한 방법으로 초산생산을 줄여왔으나 생산 그 자체를 막지는 못했다.

본 연구에서는 이러한 공정상의 문제점을 세포안의 유전학적인 지식을 통해 해결하기 위해 초산생산에 관여하는 두 유전자, phosphotransacetylase (*pta*)와 acetate kinase(*ack*) 중 첫번째 유전자인 *pta* 을 유전학적으로 block시켰다. 이렇게 제조된 초산생산이 결핍된 변이주는 호기적 배양에서 초산의 생산이 거의 없이 약 30시간만에 70g/L의 균체를 얻을 수 있었다 (Fig.7).

따라서 본 연구에서는 이러한 공정상의 문제점을 분자생물학적 정보를 통한 유전학적 기술로 해결할 수 있음을 보인것이다.

#### 제 4 절 다양한 초산생산 결핍 대장균의 대사분석

본 연구의 기초로 초산생산에 관여하는 두가지 효소의 유전자중 *pta* 의 활성이 대장균의 발효산물의 생산, 특히 D-젖산의 생산에 큰 영향을 미침을 알았다. 그러나 초산생산정도가 얼마나 D-젖산의 생산에 영향을 줄 수 있는지는 알수 없어서 초산생산정도가 다른 6가지 초산 생산 결핍 및 초산생산능이 저하된 변이주를 제조하였다. *pta* 와 *ack* 에 각각 다른 변이를 일으키거나 block 하여 초산생산으로의 flux 가 변화된 변이주를 얻었다. Fig.8 은 초산생산 flux와 D-젖산생산 flux 사이의 관계를 나타낸 것이다. 초산으로의 flux 와 D-젖산으로의 flux 가 역비례함을 알 수 있다. Fig.9 는 초산생산 flux 와 에탄올, 포름산, 숙신산등의 flux 와의 관계를 나타낸 것이다. 이를 종합해 보면 초산생산의 대사가지(Metabolic branch)인 acetyl-CoA 에서 초산과 에탄올생산은 일종의 metabolic rigidity 가 있음을 알수

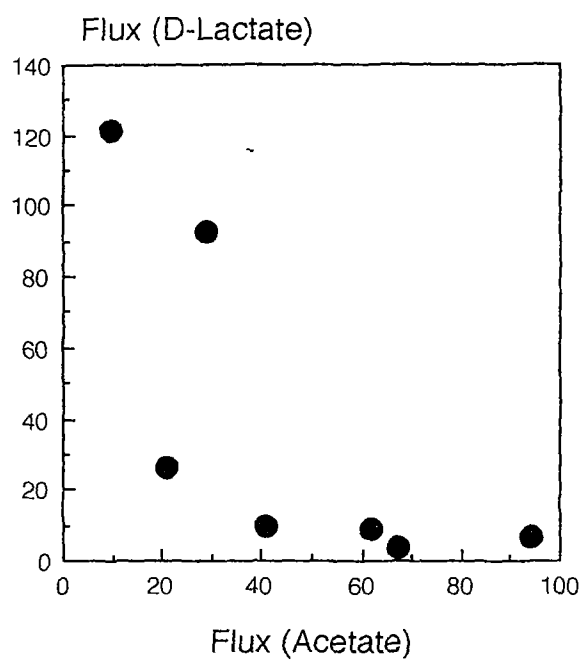


Fig.8 Effect of acetate flux on D-lactate flux

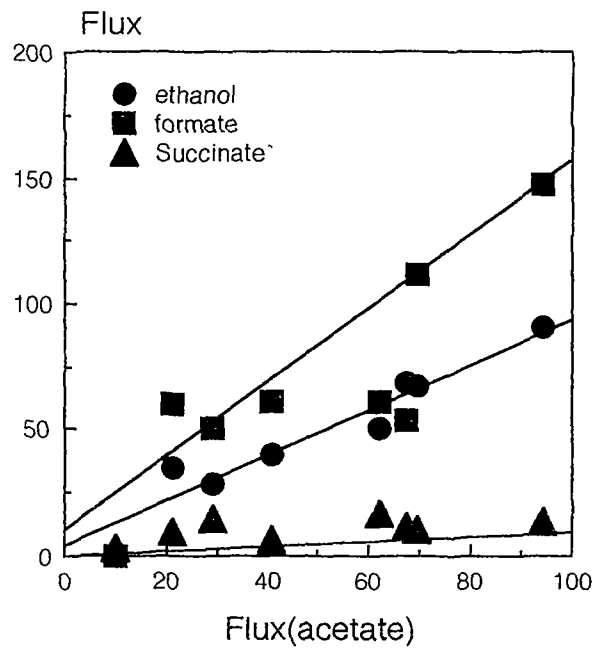


Fig.9 Effect of acetate flux on formate, ethanol, and succinate flux in *E. coli pta* mutant.

있다. 즉, 초산이 생산되면 에탄올도 생산되나 초산이 생산되지 않으면 에탄올도 생산되지 않는 대사 가지이다. 이때 초산과 에탄올이 생산되지 않으면 acetyl-CoA 의 농도가 상대적으로 증가한다. 세포는 증가된 중간대사산물을 생산이 안되도록 하거나 다른 대사경로를 통해 사용도록 하는데 본연구에서 사용된 *pta* 결핍 대장균은 전자의 경우에 해당하여 바로 전 대사반응이 억제되어 상대적으로 피루브산의 농도가 높게 되므로 D-젓산이 배양액에 축적된다. 상기한 6가지의 변이주에 대한 flux 를 Table 2 에 보였다.

#### 제 5 절 초산생산결핍 대장균을 이용한 D-젓산의 대량생산

초산생산에 관여하는 유전자 *pta* 를 유전학적으로 제거하면 대장균은 계속하여 증식하기 위해서는 해당과정에서 생산된 NADH 가 산화되어야 하는데 대장균 *pta* 변이주는 피루브산에서 D-젓산을 생산하는데 사용됨을 알았다. 그러나 혐기적조건에서는 그 증식속도가 매우 느려 공정상 불리하므로 대장균의 증식은 호기적으로 배양하여 세포농도를 충분히 올리고 D-젓산생산기는 배양상태를 질소를 불어넣어 혐기적 조건으로 변환시켜 유도하였다. Fig.10 과 Fig.11 는 각각 완전한 혐기적 조건과 부분적으로 산소를 제한하여 D-젓산 생산함을 보였다. 호기적 배양으로 세포 농도가 10g/L 정도 될때 혐기적으로 전환하여 D-젓산 생산을 유도하였는데 약50시간 만에 50g/L이상 고농도로 배양액중에 축적되었다.

#### 제 6 절 L-LDH 를 이용한 발효경로의 대사공학

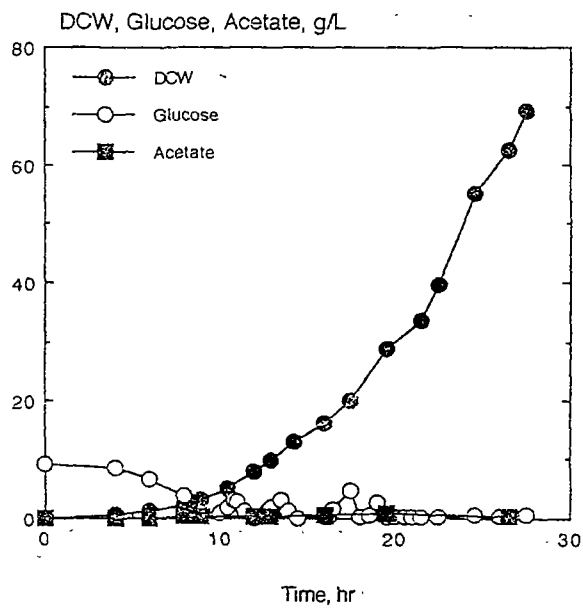


Fig.7 High density culture of acetate (-) *E. coli* by fed batch culture.



Table 2. Summary of metabolic flux analysis of *Escherichia coli* mutants

	<i>E. coli</i> RR1 <i>pta101</i>	<i>E. coli</i> RR1 <i>pta102</i>	<i>E. coli</i> RR1 <i>pta1::Tn10-lacZ</i>	<i>E. coli</i> RR1 <i>ackA101</i>	<i>E. coli</i> RR1 <i>ackA102</i>	<i>E. coli</i> RR1 $\Delta$ <i>ackA-2</i>	<i>E. coli</i> RR1	<i>E. coli</i> RR1 <i>pta101</i>
$\mu$	0.402	0.445	0.210	0.424	0.227	0.036	0.732	0.158
Qs	0.276	0.351	0.329	0.275	0.437	0.068	0.343	0.346
Q(Acetate)	0.184	0.218	0.068	0.258	0.180	0.020	0.238	0.034
Q(D-Lactate)	0.012	0.030	0.085	0.019	0.044	0.063	0.001	0.419
Q(Ethanol)	0.187	0.174	0.115	0.251	0.175	0.019	0.000	0.005
Q(Formate)	0.142	0.213	0.198	0.404	0.266	0.035	0.384	0.000
Q(Succinate)	0.032	0.058	0.030	0.039	0.028	0.010	0.036	0.010

$\mu$  : mol cell/mol cell, hr

Q : mol/mol cell, hr

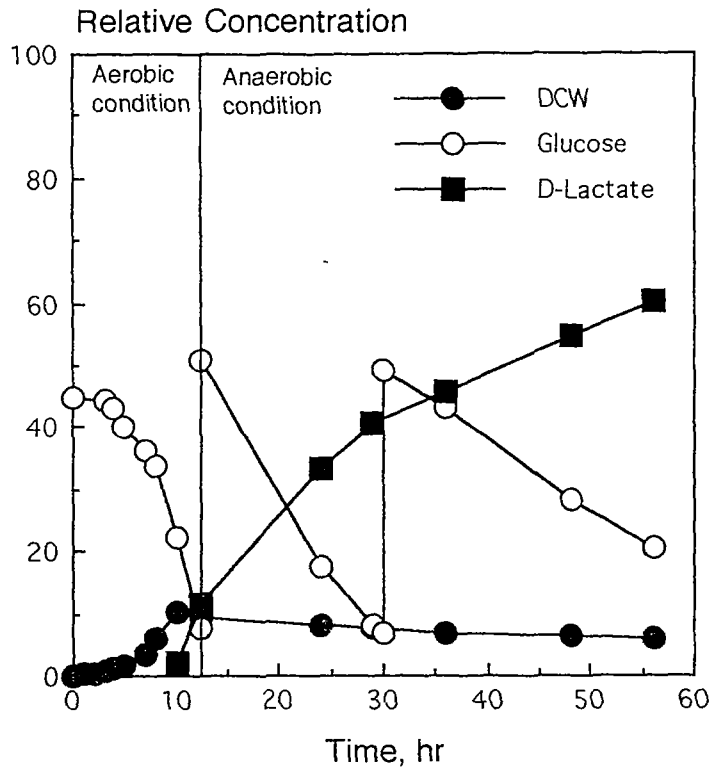


Fig.10 High production of D-lactate by fed-batch culture in completely anaerobic condition.

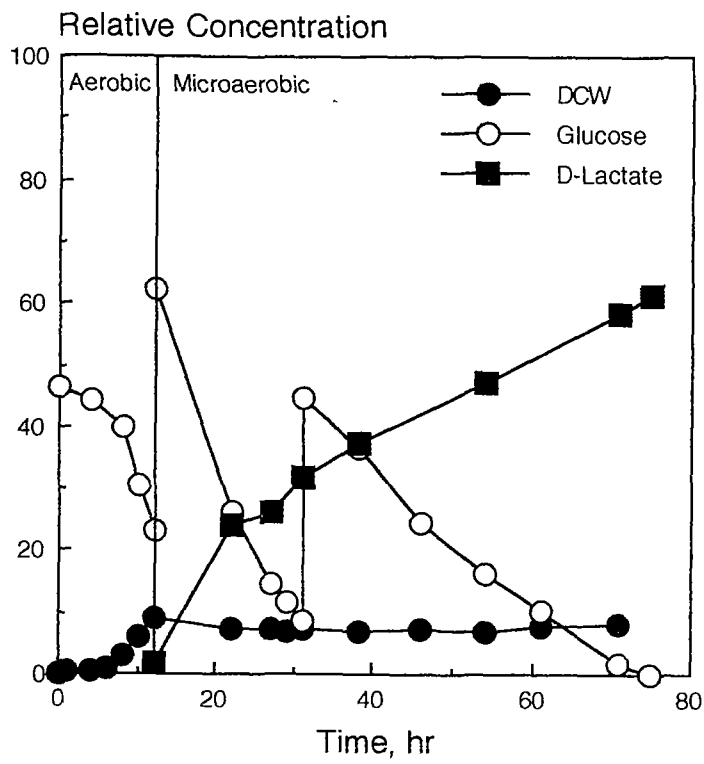


Fig.11 High production of D-lactate by fed-batch culture in oxygen-limited condition.

대장균을 외래 대사산물 생산을 위한 숙주로 사용하는 것은 여러가지로 유익하다. 현재 대장균을 이용해 산업적으로 생산하고 있거나 시도되고 있는 것으로는 Threonine 을 비롯한 아미노산류와 ethanol, PHB 등이 대표적인 예라 하겠다. 향후에는 그 영역이 넓어지리라 본다. 본연구에서는 초산 결핍 대장균을 비롯한 여러가지 대장균에 젖산균, *Lactobacillus casei* , 유래 L-Lactate Dehydrogenase 유전자(플라스미드 pLS65 )를 도입하여 변화하는 발효 산물을 관찰하였다. 대장균 HB101, 대장균 HB101/pUC19, 대장균 HB101/pLS65, 대장균 HB101/pta/pLS65 등을 호기적 조건과 혐기적 조건에서 발효산물로 조사 하였다. 그러나 기대했던 L-젖산은 호기적이거나 혐기적이거나 생산되지 않았다(Data not shown). Fig.12 는 대장균 HB101/pta/pLS65인 경우 D-젖산과 L-젖산의 profile 을 보인 것이다. L-LDH의 기질인 피브루산에 대한 affinity 가 대장균 자체의 D-LDH 보다 젖산균 유래의 L-LDH 가 낮아 생산된 젖산은 D-젖산이 대부분이었다. 이것은 젖산균이 혐기균이라는 점과 무관하지 않을 것이다. 따라서 대장균에서 원래 생산되지 않은 L-젖산을 생산하고자 할 때는 대장균 자체에 있는 D-LDH 유전자가 결핍된 변이주를 사용하는 것이 바람직하겠다.

고초균은 절대 호기성균으로 주대사부산물은 glycerol 과 2,3-butadiol 가 있다. Fig.13 는 이러한 고초균에 L-LDH 유전자(플라스미드 pUL85)를 도입한 균의 발효를 보인것이다. 고초균은 절대적 호기균이므로 호기적 배양에서는 L-젖산이 생산되지 않았고 호기적 조건으로 배양하여 세포 농도를 증가한 후 혐기적조건으로 전환할 경우 L-젖산이 소량 축적하였다. 절대 호기성균인 고초균에서는 좀 더 연구가 필요한 부분이라 하겠지만 가능성을 보여준 경우라 하겠다.

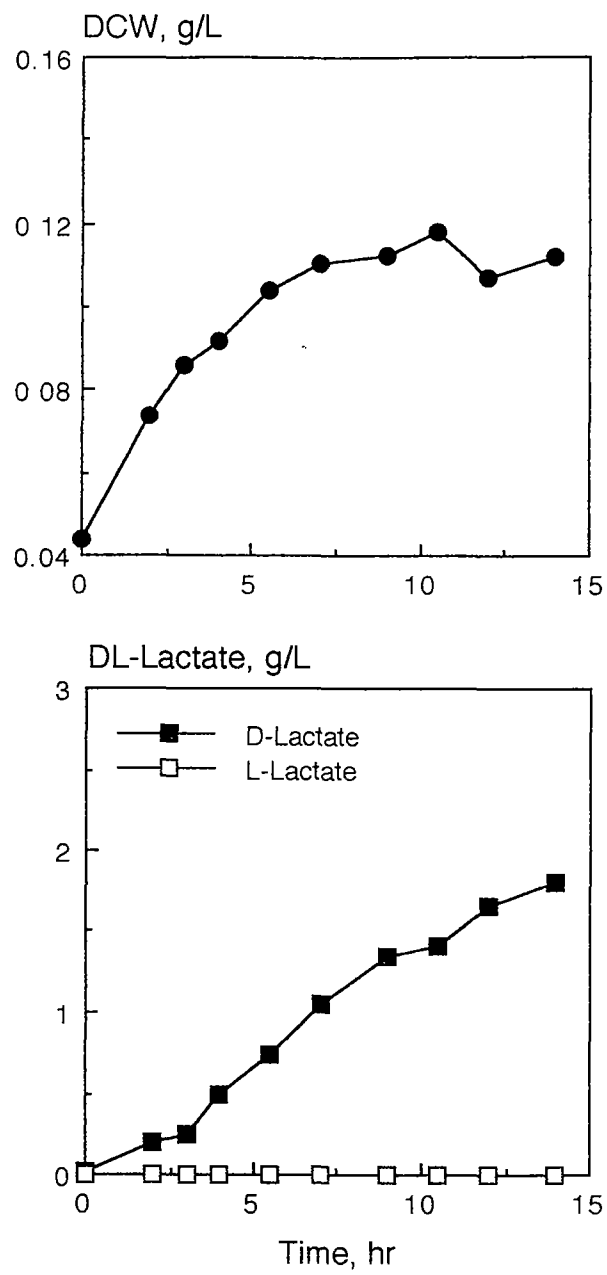


Fig.12 Batch culture of *Escherichia coli pta /pLS65*

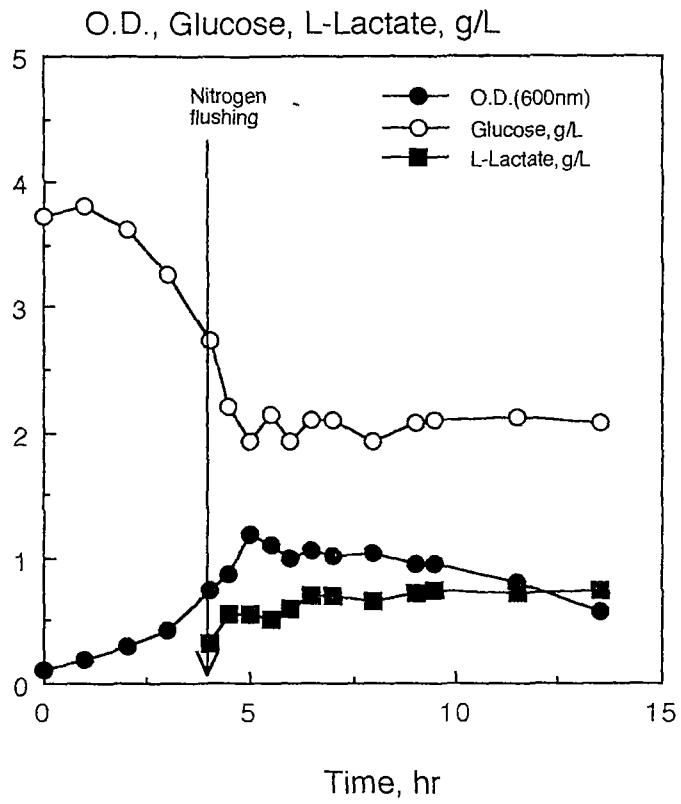


Fig.13 Batch culture of *Bacillus subtilis* IS75/pUL85

## 제 4 장 결 론 및 전 망

대장균의 대사분석을 통해 초산생산이 ethanol 과 함께 secretion 되어 대사적으로 견고함(metabolic rigidity)을 보였다. 초산생산을 유전학적으로 제거하면 에탄올을 비롯한 포름산이 동시에 생산되지 않았지만, 증식하기 위해 필요한 에너지를 얻고 남은 탄소골격은 D-젓산으로 secretion 되었다. 이는 해당과정에서 생산된 NADH의 산화와 함께 이뤄지므로 대장균내의 metabolic flux 가 세포의 증식을 위한 mechanism으로 변환하는 것으로 추측된다. 젓산균유래의 L-LDH 유전자를 초산결핍되어 metabolic flux 가 D-젓산쪽으로 흐르는 변이주에 도입하여 metabolic flux 를 관찰하였을 때 주로 D-젓산만이 축적하는 것으로 보아 동일한 반응 기질인 pyruvate 에 대한 L-LDH와 D-LDH 사이에 경쟁에서 친화력이 큰 대장균 체체의 D-LDH가 주로 작용한 것으로 추측되었다. 대장균에서 L-젓산을 생산하기 위해서는 D-LDH 가 결핍된 변이주를 사용하는 것이 유리할 것이다. 절대 호기성균인 고초균의 경우는 소량의 L-젓산을 생산하지만 좀 더 자세한 대사분석이 필요한 부분이다.

본 연구를 통하여 대사공학적으로 변환된 재조합 미생물의 생리 연구를 통하여 고농도 배양이 용이한 host - substrate system 을 확립할 수 있어서 down-stream 에서의 최적화 연구를 도울 수 있다. 또한 metabolic flux 가 변화된 재조합 균들의 physiology 를 연구함으로써 외래 대사산물 생산을 위해 만들어질 많은 recombinant host 제조시 가이드라인이 될 수 있고 그런 미생물을 사용한 최적화 연구시 중요한 정보를 제공하게 될 것이다.

## 제 5 장 참 고 문 헌

1. Vickroy, T.B., Lactic acid, *Comprehensive Biotechnology* Vol.3, Chap. 38, 7861-776
2. Garvie, E.I., Bacterial lactate dehydrogenase, *Microbiol. Rev.*, 44(1):106-139(1980)
3. Kim, S.F., S.J. Baek, and M.Y. Pack, Cloning and nucleotide sequence of the *Lactobacillus casei* lactate dehydrogenase gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8):2413-2417(1991)
4. Demirci, A. and Pometto III, A.L., Enhanced production of D(-)-lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649, *J. Indust. Microbiol.*, 11:23-28(1992)
5. de Boer, J.P., M.J. Teixeira de Mattos, and O.M. Neijssel, D(-) Lactic acid production by suspended and aggregated continuous cultures of *Bacillus laebolacticus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34:149-153(1990)
6. Clark, D.P., The fermentation pathways of *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 63:223-234(1989)
7. McCleary, W.R., J.B. Stock, A.J. Ninfa, Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 175(10):2793-2798 (1993)
8. Sun, W.J., C. Lee, J.A. George, A.L. Powell, M.E. Dajlgren, R. Greasham, and C.H. Park, Acetate inhibition on growth of recombinant *E. coli* and expression of fusion protein TGF $\alpha$ -PE40, *Biotechnol. Lett.*, 15(8):809-814(1993)
9. Lawford, H.G. and J.D. Rouseau, Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenic *Escherichia coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 39:301-322(1993)
10. Andersen, K.B. and K. von Meyenburg, Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration?, *J.*



*Bacteriol.*, 144(1):114-123(1980)

11. Stephanopoulos, G. and J.J.Valino, Network rigidity and metabolic engineering in metabolic overproduction, *Science* , 252:1675-1681(1991)



*Bacteriol.*, 144(1):114-123(1980)

11. Stephanopoulos, G. and J.J.Valino, Network rigidity and metabolic engineering in metabolic overproduction, *Science* , 252:1675-1681(1991)

