

2007年 2月

碩士學位論文

재조합 대장균을 이용한 *1,3-Propandiol*과  
*Organophosphorus Hydrolase*  
생산공정 개발

朝鮮大學校大學院

化學工學科

閔 庚 斗

재조합 대장균을 이용한 *1,3-Propanediol*과  
*Organophosphorus Hydrolase*  
생산공정 개발

Development of Fermentation Process for the Production of  
1,3-Propanediol and Organophosphorus Hydrolase Using  
Recombinant *Escherichia coli*

2007년 02월 23일

朝鮮大學校大學院

化學工學科

閔 庚 斗

재조합 대장균을 이용한 *1,3-Propanediol*과  
*Organophosphorus Hydrolase*  
생산공정 개발

지도교수 이 중 현

이 論文을 工學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2006년 10월 일

朝鮮大學校大學院

化學工學科

閔 庚 斗

# 閔庚斗의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 權圭赫

委員 朝鮮大學校 副教授 李重憲

委員 朝鮮大學校 前任教授 申鉉載

2006 年 11 月 日

朝鮮大學校 大學院

# 목 차

<i>List of Tables</i> .....	IV
<i>List of Figures</i> .....	V
<i>ABSTRACT</i> .....	VIII

서 론 .....	1
-----------	---

## 제1장 재조합 대장균을 이용한

### *1,3-propanediol (PDO)* 생산공정 개발

I-1. 서 론 .....	5
----------------	---

I-2. 재료 및 방법 .....	8
--------------------	---

2.1. 균주의 배양 .....	8
-------------------	---

2.1.1. 균주 및 보관 .....	8
----------------------	---

2.1.2. 배지 조성 .....	8
--------------------	---

2.1.3. 배양 방법 .....	8
--------------------	---

2.1.4. 분석 방법 .....	9
--------------------	---

2.2. <i>1,3-propanediol</i> 분석 조건 .....	9
---	---

2.2.1. 시약 및 기기 .....	9
----------------------	---

2.2.2. 시료 전처리 .....	9
---------------------	---

2.2.3. 이동상 조제 .....	10
---------------------	----

2.2.4. 분석 방법 .....	10
--------------------	----

2.2.5. HPLC을 이용한 농도 분석 방법 .....	10
---------------------------------	----

2.2.6. 검량선 작성 .....	10
---------------------	----

2.3. 1,3-propanediol 생산공정 개발 .....	11
2.3.1. 배지 조성 .....	11
2.3.2. 회분식 배양 방법 .....	11
2.3.3. 유가식 배양 방법 .....	11
2.3.4. 분석 방법 .....	12
<b>I -3. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. 종배양 .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. 1,3-propanediol의 분석 .....</b>	<b>14</b>
3.2.1. 용매에 따른 분리 조건 .....	14
3.2.2. 유량에 따른 분리 조건 .....	14
3.2.3. 검량선 작성 .....	15
<b>3.3. 회분식 배양 공정 최적화 .....</b>	<b>17</b>
3.3.1. 초기 탄소원 농도의 영향 .....	17
3.3.2. 회분식 발효 공정 개발 .....	17
<b>3.4. 용존 산소의 영향 .....</b>	<b>17</b>
<b>3.5. 유가식 배양 공정 최적화 .....</b>	<b>20</b>
3.4.1 유가식 배양 방법에 의한 1,3-PDO 생산성 비교 .....	20
3.4.2. 포도당의 농도의 조절 .....	20
3.4.3. 부산물의 대사경로를 제거한 균주 배양 .....	21
<b>I -4. 결 론 .....</b>	<b>30</b>

## 제2장 재조합 대장균을 이용한

### *Organophosphorus Hydrolase (OPH)* 생산공정 개발

II-1. 서론	31
II-2. 재료 및 방법	35
2.1. 시약 및 기기	35
2.2. 균주 및 보관	35
2.3. 발효 조건 및 배양 방법	36
2.3.1. 균주 배양	36
2.3.2. 종 배양	36
2.3.3. 회분식 배양	36
2.3.3. 유가식 배양	36
2.4. 분석 방법	37
2.4.1. 발현개시제의 효과	37
2.4.2. 배양액 분석	37
2.4.3. 세포 농도	37
2.4.4. 포도당의 농도	37
2.4.5. OPH의 활성화도 측정	38
2.4.6. OPH의 세포 침전물(Total cell lysate)	38
2.4.7. OPH 생산 효소 발현 확인	38
II-3. 결과 및 고찰	42
3.1. OPH 생산을 위한 <i>inducer</i> 의 효과	42
3.2. 발효 시간에 따른 OPH 생산	42
3.3. 초기 포도당 농도의 영향	45
3.4. 유가식 발효	45
II-4. 결론	55
참고 문헌	56

## *List of Tables*

<i>Table 1.</i> Media composition for 1,3-propanediol production .....	13
<i>Table 2.</i> Effect of fed-batch operation methods on 1,3-propanediol production .....	28
<i>Table 3.</i> Effect of controlled glucose level on 1,3-propanediol production .....	29
<i>Table 4.</i> Organophosphorus hydrolase activity measurement protocol ..	41



## *List of Figures*

<b>Fig. 1.</b> Metabolic pathway from glucose to organic acids and alcohol ...	6
<b>Fig. 2.</b> Standard curve for the determination of 1,3-propanediol, acetic acid, glucose, and glycerol concentration .....	16
<b>Fig. 3.</b> Effect of dissolved oxygen (DO) on 1,3-PDO production DO level : about 10 % .....	18
<b>Fig. 4.</b> Effect of high level of DO on 1,3-PDO production DO level : over 40 % .....	19
<b>Fig. 5.</b> pH-stat : glucose and glycerol concentration, cell mass, 1,3-PDO and acetic acid concentration .....	22
<b>Fig. 6.</b> Effect of feedback glucose concentration level control on 1,3-PDO production .....	23
<b>Fig. 7.</b> The change of 1,3-PDO production with feedback glucose concentration at 5 g/L .....	24
<b>Fig. 8.</b> The change of 1,3-PDO production with feedback glucose concentration at 0-1 g/L .....	25
<b>Fig. 9.</b> The change of 1,3-PDO production with limited glucose concentration .....	26
<b>Fig. 10.</b> 1,3-PDO production with recombinant <i>E. coli</i> which was genetically modified to minimize organic acid production .....	27
<b>Fig. 11.</b> Standard curve for the determination of cell mass with cell optical density (600nm) .....	39
<b>Fig. 12.</b> Standard curve for the determination of glucose concentration. ..	40
<b>Fig. 13.</b> SDS-PAGE analysis of before and after addition of inducer Separated by SDS-PAGE with a 10 % gel under equal condition Positions of molecular size markers are shown in kilodaton ...	43

<b>Fig. 14.</b>	SDS-PAGE analysis of fermentation samples Separated by SDS-PAGE with a 10 % gel under equal condition The figure shows the time course of OPH production .....	44
<b>Fig. 15.</b>	The dry cell weight and glucose concentration with 30 g/L initial glucose concentration. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration ...	47
<b>Fig. 16.</b>	The intra and extra cellular OPH concentration produced with batch fermentation with 30 g/L initial glucose concentration. symbols: open triangles, extra cellular OPH; closed triangles, intra cellular OPH .....	48
<b>Fig. 17.</b>	The dry cell weight and glucose concentration with 60 g/L initial glucose concentration. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration ...	49
<b>Fig. 18.</b>	The intra and extra cellular OPH concentration produced with batch fermentation with 60 g/L initial glucose concentration symbols: open triangles, extra cellular OPH; closed triangles, intra cellular OPH .....	50
<b>Fig. 19.</b>	The dry cell weight and glucose concentration with fed-batch fermentation. Intermittent feeding method. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration .....	51
<b>Fig. 20.</b>	The intra and extra cellular OPH concentrations produced with fed-batch fermentation. Intermittent feeding method. symbols: open triangles, extra cellular OPH; closed triangles, intra cellular OPH. ....	52
<b>Fig. 21.</b>	The dry cell weight and glucose concentration with fed-batch fermentation. Continuous feeding method. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration .....	53

**Fig. 22.** The intra and extra cellular OPH concentrations produced with fed-batch fermentation. Continuous feeding method.  
symbols: open triangles, extra cellular OPH; closed triangles, intra cellular OPH. .... 54

# *ABSTRACT*

## *Development of Process for the Production of 1,3-Propanediol and Organophosphorus Hydrolase Using Recombinant *Escherichia coli**

Min Kyoung-Du

Advisor : Prof. Lee Jung-Heon Ph.D.

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

Developments of sustainable technologies for the production of renewable materials from agricultural feedstock are rapidly growing issues due to upsurging oil price in world market. More than thousand tons of polyester are produced every hour in the world and polyethylene terephthalate (PET) occupy the major fraction of this amount. 1,3-Propanediol (PDO) is the key intermediate for the synthesis of PET. The recombinant *E. coli* produced 1,3-PDO from glucose and the production of 1,3-PDO was increased with feedback glucose concentration using fedbatch fermentation. The maximum 1,3-PDO concentration produced was 43 g/l after 60 hrs fermentation. The glycerol production was minimized by controlling the glucose concentration less than 1 g/L.

The development of a fedbatch fermentation process for the production of organophosphorus hydrolase (OPH) by *E. coli* pET812 is described in this manuscript. Originally, the maximum OPH concentrations attained by batch fermentation were as low as  $4 \times 10^5$  U/l because cell growth and OPH

production were inhibited by a high concentration of initial glucose. To develop a fedbatch fermentation process for obtaining higher concentrations OPH, highly concentrated glucose solution (500 g/l) was added intermittently or continuously to increase the carbon source concentration. Eventually,  $3.2 \times 10^6$  U/l of OPH was produced with fedbatch fermentation in 24 hrs. This was 8 times higher than that with conventional batch fermentation. A total concentration of 399-441 mg/l of OPH was produced, which was 4 times higher than that reported when using *E. coli*. Nearly half (44 %) of the produced OPH was secreted into the culture solution.

## 서 론

과학기술의 발달과 인구의 증가로 한정된 석유 에너지를 보충할 대체자원의 개발에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 이루어지고 있다. 최근 장래 에너지원의 부족을 해결할 수 있는 하나의 대안으로서 미생물을 이용하여 유용물질의 생산하고자 하는 생물전환 기술이 관심을 모으고 있다.

현재 옥수수 톤당 가격은 100달러, 설탕가격은 톤당 200달러 정도이므로 중량 비로 볼 때 각각 원유의 1/4 혹은 1/2 정도에 불과하다. 또한, 생물기술의 발달로 인하여 생축매의 기능과 공정의 효율성이 크게 향상되어 전분(glucose, 글루코오스, 포도당)을 출발물질로 하는 여러 가지 화학제품이 이미 가격 경쟁력을 갖게 되었다. 지속적인 원유가격과 환경비용의 증가, 그리고 생물공학기술의 비약적인 발전을 감안할 때 industrial biotechnology(산업 생물공학기술, BT) 응용제품의 경제성은 계속해서 증가할 것이다. BT는 인류의 염원인 풍요롭고 건강한 삶을 위한 의료, 환경, 식량, 에너지 등 모든 영역에 걸쳐 지대한 공헌을 하고 있으며, 그 영향은 더욱 확대될 것이다.

현재 BT가 가장 큰 영향력을 미치는 분야는 의료분야로 이를 유럽에서는 red biotechnology로 표현하고 있으며, 또한 농업분야에 적용되는 BT를 green biotechnology로 분류하고 있다. 이러한 red BT, green BT를 1세대, 2세대 BT로 정의한다면 생물공학기술인 white BT는 제 3세대 BT로 분류할 수 있다. 생물공학기술은 각종 소재(chemical substances), 에너지 등을 생산하기 위한 첨단 생물 공학 기술이며, 재생 가능한 자원(바이오매스 등)과 생축매를 사용하므로 오염 발생과 에너지 소모가 적은 청정 기술이다. White BT를 이용하여 생산되는 산업소재 제품은 매우 다양하며, 이들은 최종 제품이 될 수도 있고 혹은 다른 제품을 생산하는 원료로 사용되기도 한다.

최근에는 생물전환 기술보다 더 나아가 유전공학기술로 미생물을 통해 생산기술이 많이 이용되고 있다. 대표적인 미생물로 대장균(*E. coli*) 및 효모(yeast)를 사용하고 있다.

일반적으로 사용되는 생명공학제품을 생산하는 발효기 종류로는 교반식 발효기, 유동층 발효기, 고정화 발효기, 관형 발효기, 중공사막 반응기, 세포 부착식 발효기 등이 있으며 이를 개량한 유사한 종류의 발효조들이 개발되어 있다. 이러한 발효조의 선택은 각 균주의 특성에 따라 결정되며, 이들 균주의 특성은 균주들이 자라난 환경에 따라 정해지게 된다. 그러므로 초기 단계에서 진행되는 균주의 개발은 향후 이용될 발효조에 따라 상호 연관성을 갖고 추진되어야 한다. 따라서 대부분 기업의 경우에는 그 회사에서 보유한 발효장치에 맞는 공정을 개발할 수 있도록 균주를 선정하여 개발하고 있다. 제품개발의 경우, 생산회사가 보유한 기기의 특성을 맞추는 필요가 있으며 이에 따라 전체 공정의 생산시기가 바뀌기도 한다. 전체적인 관점으로 초기 개발단계에서 생산시설에 관한 정리가 이루어져야 할 것이다.<sup>1)</sup>

생산 공정 개발에서 생산 발효조의 형태가 결정되면 이로부터 제품의 생산성을 최대로 할 수 있는 운전 방법에 대한 결정을 한다. 발효조의 운전 방법은 세포의 성장 및 생산 특성에 따라 결정한다. 반응기 운전의 최적화에 따라 생산성은 정도에 따라 크게 차이 날 수 있으며 이의 최적화로 운전 비용절감 및 제품의 생산가를 감소시킬 수 있다. 운전 방법에는 회분식, 유가식, 연속식 발효 운전방법 등이 있으며 이는 균주 성장 및 제품 생산 시 영양분의 공급형태에 따라 결정되게 된다.

효모와 항생물질의 생산과 같은 많은 산업상황에서, 반응기들은 기질의 주입은 있고 유출은 없는 반-연속적 형태로 운전된다. 예를 들어, 제빵용 효모생산에서 발효의 시작과 에탄올 생산에 있어서 글루코스(glucose, 포도당)가 과량으로 초과하게 되면 세포수율이 감소하는 결과를 초래하게 되는데, 글루코스 농도는 거의 제로의 상태로 유지하게 되어 기질이 세포로 획득되어지는 최대 전환을 유지하게 된다. 이처럼, 배양조 내의 기질의 농도를 제어하기 위하여 사용되는 배양 방법의 일종이 유가식 배양 방법이다.

생물공학에서 대부분의 생물반응기에서의 세포배양은 생산단가 절감을 위해 고농도 세포배양을 하고 있다. 고농도 세포배양은 회수율 증가와 함께 분리비용의 절감이라는 두 가지 문제를 모두 해결해 준다. 때문에 현재 산업상황에서 유가식 배양 공정을 많이 이용하고 있다.

유가식 배양은 회분식 배양의 변형으로 기질 또는 다른 영양소를 계속 공급하는 형태이다. 기질을 공급하는 형태는 단속공급(intermittent feeding) 또는 연속공급(continuous feeding)으로 나뉘어 지는데 이는 발효조 내의 기질농도를 발효에 지장을 받지 않을 정도로 유지하기 위해 발효의 특성에 따라서 조절된다.

단속공급의 경우는 공정의 편의성 및 적용의 용이성 때문에 많은 발효공정에서 이용되고 있는 방법이다. 기질이 고갈 되었을 때 고농의 기질을 일시에 넣어 주어 농도를 증가 시킨 후 기질이 고갈될 때까지 기다린 다음, 다시 넣어주는 형태로 많은 논문에서 흔히 볼 수 있는 형태이다. 연속공급은 유량의 변화에 따라서 일정량을 공급하든지 지속적으로 공급하는 형태를 지니게 된다. 연속공급에서 유량을 일정하게 유지하는 경우는 세포는 성장하지 않고 생산물만 생산하는 단계에 있는 상태로 기질을 전환하는 공정을 수행하는 경우에 필요한 유량제어 방법이다. 연속공급의 형태가 지수함수의 형태를 나타낼 때의 경우는 세포가 성장기에 있는 경우 세포의 농도가 지수함수적으로 증가함으로써 기질의 소모속도도 지수함수적으로 증가하기 때문이다.<sup>2)</sup>

또한, 제어하는 방법에 따라 inferential feedback control, 기질농도의 feedback 제어, 기질농도의 feedforward 제어가 있다.

먼저, inferential feedback control은 반응기 내부의 제어하고자 하는 상태변수를 빠른 시간 내에 직접 측정할 수 없을 때 자주 사용되는 방법으로 추론적인 방법을 많이 사용한다. 이러한 방법으로 이용되는 반응기의 측정 장치 이름을 이용하여 pH-stat<sup>3,4,5,6,7)</sup>, DO-stat<sup>8)</sup>, RQ 제어<sup>9)</sup> 등의 방법을 사용하게 된다.

이 중 가장 많이 사용되는 방법의 하나는 pH-stat이다. 주요한 탄소원이 고갈되었을 때 pH가 변화한다는 관찰에 기초를 두고 있다. 탄소기질이 고갈되었을 때 세포로부터 배출된 암모늄 이온이 발생하여 pH도 증가하거나, 유기산 등이 생성하여 pH가 감소하는데, 이 때 pH의 변화에 따라서 기질을 공급한다. 비슷한 방법으로 DO-stat은 기질의 고갈에 따른 DO 증가로부터 세포가 기질이 필요함을 인식하여 기질의 유량 펌프를 작동시키는 원리를 이용한 것이다. 위의 두 방법은 기질의 농도를 일정 농도 이상으로 유지할 필요가 있을 때 쓰이는 방법으로 대부분의 재조합 미생물을 사용한 단백질 생산의 경우에 기질제어 작용이 심하기 때문에 사용되어 상당한 효과를 보고 있다.<sup>10,11,12)</sup>



단순배지에서 DO-stat은 pH-stat보다 영양분의 고갈에 더 민감하게 반응하며, yeast extract나 peptone과 같은 복잡한 탄소-질소 기질이 탄수화물 기질로써 동시에 사용되었을 때는 세포가 계속해서 복합 기질을 이용하기 때문에 탄소원이 고갈되었을 때 DO의 변화는 그렇게 크지 않다. 그러므로 유사 단순배지 또는 복합배지를 사용하였을 때 pH-stat 방법이 훨씬 더 적당하다. RQ제어 방법은 세포의 생리적인 상태를 기질의 유량을 변화시켜 우리가 원하는 상태로 맞추어 생산을 최대화 하는 상태로 만든 제어이다.

두 번째로 기질농도의 feedback 제어는 발효조 내의 기질의 농도를 실시간으로 측정이 가능 할 경우 기질의 농도를 측정하여 제어하는 방법을 사용할 수 있다. 간단하게는 on-off 제어를 사용하여 기질의 농도가 원하는 농도보다 높으면 off 상태로 유량을 줄이고 농도가 높으면 on 상태로 유량을 증가시켜 우리가 원하는 농도로 제어한다. 또한, PID 제어 알고리즘을 이용하여 더욱 정교하게 제어하는 방법도 있다. PID 제어를 사용하는 경우에 autotuning 방법을 이용하여 제어기의 상수를 결정하는 방법 등이 제안되어 사용되고 있다. 이러한 방법은 대계의 생물공정이 시간에 따라 변하는 공정으로 최적 기질의 농도가 시간에 따라 변함에도 불구하고 이를 고려하지 못하고 Static 공정으로 단순화하여 기질의 농도를 일정하게 유지시키려는 방법을 사용할 경우 생산효율성을 감소시킬 수도 있다.

마지막으로 기질농도의 feedforward 제어는 기질의 농도는 대부분 실시간으로 측정이 힘들고 분석시 지연시간이 있고 측정 장치가 정교하지 않을 경우 시간에 따른 세포의 기질 소모량을 미리 예측하여 이를 토대로 기질의 유입량을 결정하여 기질의 농도를 제어하는 방법이 있다.

일반적으로 공정을 최적화 하는 방법으로는 최적 세포 생산 조건과 체적 생산 조건이 다르기 때문에 초기에는 세포생산에 최적인 상태로 유지하다가 세포 성장이 어느 정도 끝나면 최적 생산 조건으로 만들어 주는 방법이 사용된다.

따라서 본 연구에서는 회분식 발효결과를 토대로 최적 세포 생산 조건을 찾은 후, 유가식 발효 공정을 통해 최적 생산 조건을 찾고자 하였으며, 세포의 성장 속도가 빠르고 생산 능력이 우수한 재조합 대장 균주를 통해 발효기를 이용하여 생산물을 효율적으로 생산하고자 하였다.

## 제1장 유전자 재조합된 대장균을 이용한

### 1,3-propanediol (PDO) 생산공정 개발

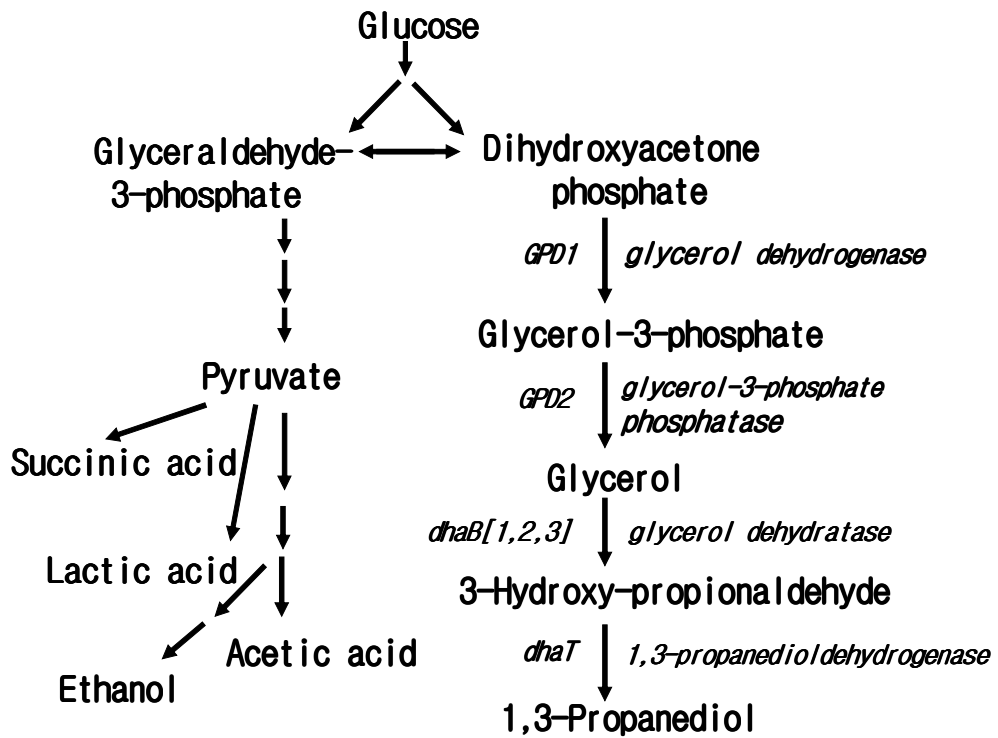
#### I -1. 서 론

최근 들어 환경적인 문제와 함께 화학공정에 있어 친환경적인 방법에 의한 생산공정이 각광을 받고 있고, 그 중 glycerol 발효전환에 의한 1,3-propanediol 생산이 크게 대두되고 있다. 이에 대한 연구는 1981년 August Freund에 의해 처음 발견되었지만 단지 용제, 다이옥산의 생산제품, 특별한 폴리머 등의 이용에만 국한되었다. 하지만 이후 1,3-propanediol은 폴리에스테르, 폴리에테르, 폴리우레탄생산과 같은 많은 합성반응에 있어 축중합을 위한 단량체로 사용될 수 있음이 밝혀지면서 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>13)</sup> 단량체로서 만든 플라스틱과 중합체인 1,2-propanediol, butanediol, ethylene glycol로 만든 제품과 비교하여 우수한 광학 안정성을 나타낼 뿐만 아니라 polyglycol-type의 윤활제와 용매로도 사용할 수 있다.<sup>14,15)</sup>

기존에 듀폰사와 쉘사는 화학적인 방법을 통하여 폴리에스테르의 주원료가 되는 1,3-propanediol을 합성하여 생산하여 왔다. 이러한 화학적인 합성은 상당한 고온, 고압을 요구하여 경제적인 1,3-propanediol 생산에 걸림돌이 되어 왔으며, 또한 상당량의 환경오염 폐기물을 양산하는 것으로 알려져 왔다.

1998년 미국의 듀폰(DuPont)사의 연구진은 효모(yeast)가 포도당을 글리세롤로 전환함을 밝혀, 유전자 조작된 대장균(*E. coli*)을 이용하여 포도당이 유기산류(organic acid)와 알코올(alcohol)로 변환되는 것을 찾아내었다(Figure 1).<sup>16)</sup>

이렇게 개발된 대장균은 농도 135 g/L, 생산성 3.5 g/L · h, 그리고 포도당으로부터 질량수율은 약 51 %로 1,3-propanediol을 생산할 수 있음을 밝혔다. 생산된 1,3-propanediol과 TPA(terephthalic acid)를 고분자시켜 PTT(polytrimethylene terephthalate)을 합성하는데 성공했으며, 이를 Sorona<sup>TM</sup>라는 이름으로 판매하고 있다.



*Figure 1.* Metabolic pathways from glucose to organic acids and alcohol

본 연구에서는 비슷하게 유전자 재조합된 균을 유가식 배양 공정을 통해 이에 버금가는 1,3-propanediol을 생산하고자 연구를 진행하였다.

일반적으로 1,3-propanediol 생산은 화학적 (acrolein의 수소화, ethylene oxide의 수소첨가), 생물학적 (*Clostridia*와 *Enterobacteria*를 이용한 glycerol를 발효전환, *Clostridium strains*을 이용하여 co-substrate로 sugars와 glycerol를 발효 전환) 방법이 이용되지만, 점차 화학적인 방법에서 생물학적 방법으로 생산 공정이 전환되고 있다.<sup>13-16)</sup>

지금까지 보고된 1,3-propanediol 생산 연구 결과<sup>17-23)</sup>를 보면 생산량은 10~20 g/L으로 낮았다. 또한, 생산량을 늘리기 위해 고농도 세포 배양을 할 경우 생육 저해 현상이 나타나며, 발효시간의 장기화로 인해 생산성 (g/L/hr)이 많이 떨어졌다. 이를 보완하기 위해 본 연구에서는 생육 저해가 없이 1,3-propanediol을 생산할 수 있는 돌연변이 균주를 이용한 유가식 배양공정을 통해 1,3-propanediol 최적 조건을 찾고자 하였다.

유가식 배양공정 중 가장 효과적으로 사료되는 2가지 방법을 선정하여 연구를 진행하였다. pH를 control하기 위해 유입된 NaOH의 양과 비례하여 포도당을 주입하는 pH-stat와 DNS법을 이용하여 glucose의 농도를 실시간으로 측정(분석시간 30분)이 가능하므로 feedback control 공정을 통해 최적 생산 조건을 찾고자 하였다.

## I -2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주 배양

#### 2.1.1. 균주 및 보관

본 연구에서 사용한 균주는 유전자 재조합된 *E. coli* (CJ-PDO, CJ-U26)을 사용하였으며, 영양고체 배지에서 37°C에서 150rpm에서 배양하여 long-term stock solution(배양액 1ml를 취하여 12,000rpm에서 10min간 원심분리를 거친 후 상등액을 버리고 0.9 % NaCl 용액 1ml를 넣고 잘 섞어준다. 세척과정을 2회 거쳐 순수한 세포만 취한 후 0.2ml의 LB medium을 첨가하고, 50 % glycerol 0.8ml를 넣고 잘 교반해 준다)으로 제작하여 -70°C에 보관하며 종 배양에 사용하였다.

#### 2.1.2. 배지 조성

균의 최적 성장 조건을 알아보기 위해 균지 배지 조성은 *E. coli*의 최적 생산 배지로 알려진 LB medium (NaCl 1g, Yeast extract 0.5g, tryptone 1g of deionzed water 100ml)에 추가적으로 glucose 1~5 g/L와 glycerin 1~5 g/L을 첨가하여 균주의 최적 성장 조건을 찾고자 하였다. 또한, 항생제로는 ampicillin (100mg/ml), kanamicillin (50mg/ml)을 사용하였다. ampicillin (100mg/ml)은 ampicillin sodium 1.0g을 멸균된 deionzed water 10 ml를 넣어 완전하게 녹인 후 0.2 $\mu$ m filter로 이물질을 제거하였다. 그런 다음 1.0ml씩 취하여 1.5ml tube 넣고 -20°C에 냉동보관 하여 사용하였다. kanamicillin (50mg/ml)은 kanamicillin sodium 0.5g을 취하여 같은 방법으로 제조하여 사용하였다. 균주의 배지 조성은 Table 1에 나타나 있다.

#### 2.1.3. 배양 방법

300ml 삼각플라스크에 100ml의 배지를 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 후 clean bench에서 배지를 냉각시키며, UV(Ultraviolet : 자외선)를 쬐어줌으로써 완전하게 멸균을 시킨 후, 100ml 정도의 배지에 필터링 된 항생제인 ampicillin (100mg/ml) 0.1ml, kanamicillin (50mg/ml) 0.1ml를 넣은 후 종균을 접종하고 37°C에서 150rpm으로 교반시키면서 24hr 배양하였다.

#### 2.1.4. 분석 방법

균의 성장을 알아보기 위하여 2hr 간격으로 Sample을 취한 후, 분광광도계(Shimadzu, UV-1201)를 이용해 600nm에서 적당하게 희석하여 cell optical density (탁도)를 측정하였다.

## 2.2. 1,3-propanediol 분석 조건

#### 2.2.1. 시약 및 기기

Glucose(포도당)와 대사산물인 glycerol (글리세롤), 1,3-propanediol (1,3-PDO), ethanol (에탄올), succinic acid (숙신산), lactic acid (젖산), acetic acid (초산)를 측정하기 위해 HPLC system을 사용하였다. 사용된 Column은 SUGAR SH1011 (8mm ID × 300mm Length) Shodex이며, 검출기로는 RID-6A(Refractive Index Detector. 굴절률 검출기. Shimadzu사) Detector를 이용하여 분석하였다.

Solvent(이동상)으로는 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>과 HPLC급 Water (Fisher)을 사용하였고, standard시약으로는 glucose (동양과학), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (동양과학), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (동양과학), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (동양과학), formic acid (Sigma), fumaric acid (Sigma), ethanol (동양과학), succinic acid (Sigma), glycerin (동양과학), 1,3-PDO (Sigma), lactic acid (동양과학), acetic acid (동양과학)을 10 g/L로 조제하여 사용하였다.

#### 2.1.2. 시료 전처리

시료 전처리는 여러 가지 방법 (원심분리, 여과, 분별침전, 증류, 용매추출법, 고체상 추출법, 고체상 미량추출법) 중 가장 일반적인 유기물 전처리 방법으로써 원심분리와 여과를 이용하였다. 먼저, 발효 공정에서 취한 sample 중 1ml를 취하여 고속 원심분리기 (High speed centrifuge. 한국한일과학)로 4℃, 12,000rpm에서 10min동안 원심분리를 하여 대사산물이 녹아있는 상등액(배양액)과 cell(세포)을 분리하였다. 그런 다음, 이물질을 0.2 $\mu$ m filter (SRP 25. Milipore)를 이용하여 완전하게 제거한 후 냉장보관 (4℃)하여 분석시 주입시료(Sample of Injector)로 사용하였다.

### 2.1.3. 이동상 조제

이동상으로는 HPLC급 water (동양과학)와 98 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (동양과학)을 이용하여 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 만든 후, 용매에 존재하는 air, oxygen, bubble 등을 없애기 위해 0.45 $\mu$ m membrane filter를 이용하여 이물질을 제거하여 이동상으로 사용하였다.

### 2.1.4. 분석 방법

HPLC (High Performance Liquid Chromatography, 고성능 액체크로마토그래피)를 이용하여 발효조 내의 배지 및 대사산물의 분리 및 정성, 정량분석을 하기 위하여 일정한 농도(10 g/L)로 standard 시약을 제조한 후, 0.20 $\mu$ m filter(SRP 25, Millipore)로 거쳐 이물질을 제거한 후 주입(Injector) 시료(sample)로 사용하였다. 최적 분리 조건을 선정하기 위하여 용매와 유량(ml/min)에 따른 분석 조건을 확립하고자 하였다.

### 2.1.5. HPLC를 이용한 농도 분석 방법

먼저, 일정한 조건(칼럼의 온도는 50 $^{\circ}$ C, Pump의 유량은 1.0ml/min, 압력은 5.0MPa 이하로 유지)으로 기기를 안정화 시킨 후 용매로서 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 Water에 따른 혼합물을 분리능을 살펴보았다.

용매를 선정한 후, 유량(0.8~1.2ml/min)에 따른 혼합물의 분리능을 살펴보았다. 혼합물의 분리 및 정성분석을 확립한 후, 가장 잘 분리된 혼합물을 선정하여 검량선(대사산물의 정량분석)을 작성하여 발효 생산물의 농도를 측정하고자 하였다.

### 2.1.6. 검량선 작성

검량선은 혼합물 중 잘 분리된 시료 4개를 선정한 후 일정하게 희석 또는 제조된 standard sample로 분석하였다. 먼저, 2.500 g/L(10 g/L의 sample 0.5ml 4개 혼합 ; 10 g/L 4배 희석)일 때 각각의 peak를 측정 한 후, 이를 2배 희석하여 1.250 g/L(2.500 g/L의 sample 1.0ml + HPLC급 water 1.0ml)일 때 peak를 측정하며, 다시 2배 희석하여 0.625 g/L(1.250 g/L의 sample 0.5ml + HPLC급 water 0.5ml)일 때 peak를 각각 측정 하였다. 그런 후 농도 대 peak로 검량선( $y = ax + b$  ; 여기서, y는 sample의 농도, x는 sample의 Peak, a는 기울기, b는 y절편을 나타낸다)을 작성하였다.

## 2.3. 1,3-propanediol 생산공정 개발

### 2.1.1. 배지 조성

발효용 배지로는 Table 1과 같다. 회분식 발효의 배지를 만들 경우에는 glucose<sup>a)</sup> 60g를 증류수로 녹여 전체량을 300ml로 하여 500ml flask에, 그 외 배지<sup>b-g)</sup>를 증류수로 녹여 1,500ml로 만들어 5L 발효기에 넣은 후 각각 멸균기를 이용하여 121℃에서 15min분간 멸균 처리한 후 혼합하여 온도 및 pH 등을 안정화 시킨 후 접종하였다.

유가식 배양의 농축 배지<sup>#1, #2)</sup>의 경우에는 200ml의 증류수를 적당하게 가열한 후 glucose<sup>a)</sup>을 600g을 녹여 전체량을 700ml로 하였다. 그 외 배지<sup>b-g)</sup>는 증류수로 녹여 300ml가 되도록 한 후, 마찬가지로의 방법으로 멸균 처리한 후 사용하였다.

항생제<sup>h,i)</sup>인 ampicillin 및 kanamycin은 멸균된 증류수로 희석하여 완전히 녹인 후, 2.0 $\mu$ m filter로 여과하여 1ml씩 분주하여 냉동(-20℃) 보관하였다. 필요할 때 마다 4℃에서 해동하여 사용하였다. 마찬가지로 비타민<sup>j,k)</sup> 및 발현개시제인 IPTG<sup>l)</sup>도 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 냉동(-20℃) 보관하여 사용하였다.

### 2.1.2. 회분식 배양 방법

발효기는 DO-센서와 pH-센서를 장착한 KF-5L의 한국발효기를 이용하여 냉각수를 순환하여 자동온도 조절이 가능하도록 하였고, autoclave를 사용하여 121℃에서 15min동안 멸균처리한 후 발효시켰다.

종배양액 접종 전 pH는 8N-NaOH와 1N-HCl로 6.8으로 조절하였으며, 교반속도는 300~600rpm으로 DO를 50% 이하로 유지시켜 주었다. 또한 온도는 37℃로 했다. 2시간 정도 안정화시킨 후, 37℃에서 종배양액 200ml를 발효 배지 1.8L에 접종하여 배양하였으며, 분석을 위한 시료는 sampling port를 통해 채취하였다.

### 2.1.3. 유가식 배양 방법

본 연구에서는 여러 가지 유가식 배양 공정 중 가장 적합한 방법으로 사료되는 두 가지의 배양 공정을 채택하였다.



첫 번째 방법은 배양 초기에는 탄소원인 glucose가 고갈되면서 pH가 상승하며, glucose가 glycerol로 전환되는 시기에 부산물로 유기산이 생성되어 배지의 pH가 낮아진다는 점을 착안하여 pH가 떨어질 때마다 glucose를 주입하도록 하였다(pH-stat).

두 번째 방법은 초기에 용존산소량 포화용존산소량의 50% 이하로 조절하면서 회분식 배양을 수행하다가 cell mass가 기하급수적으로 증가할 경우 농축된 배지를 공급하여 glucose의 농도를 0~5 g/L가 유지되도록 하였다(feedback control).

#### 2.1.4. 분석 방법

분석을 위한 시료는 일정시간(2~6hr)마다 10ml(5ml×2)씩 취한 후, 5ml 배양액은 냉동보관 하였으며, 나머지 5ml 배양액을 이용하여 세포 농도 및 포도당 농도를 측정 하였다.

배양 후 생성된 발효 산물은 12,000rpm. 30min, 4℃ 조건 하에서 원심분리 한 후 상등액을 회수하여 0.20µm 필터로 여과하여 HPLC를 통해 1,3-PDO 및 유기산을 분석하였다.

또한, cell mass는 1.5ml를 tube를 통해 50℃에서 1day 동안 건조하여 1ml 중에 포함되어 있는 cell 무게를 측정하여 건체량을 분석하였다.

**Table 1.** Media composition for of 1,3-propanediol production

Component	Concentration [g/L]	Concentrated media for pH-stat [1.0L] <sup>A)</sup>	Concentrated media for feedback control [1.0L] <sup>B)</sup>
Glucose <sup>a)</sup>	30	600	600
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>b)</sup>	3.0	15.0	15.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>c)</sup>	8.0	40.0	40.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O <sup>d)</sup>	0.5	2.5	2.5
Yeast extract <sup>e)</sup>	5.0	25.0	25.0
Formic acid <sup>f)</sup>	1.2ml	6.0ml	6.0ml
Fumarate <sup>g)</sup>	2.91g	14.55g	14.55g
Amp(100mg/ml) <sup>h)</sup>	1ml	1.0ml	1.0ml
Kan(100mg/ml) <sup>i)</sup>	1ml	1.0ml	1.0ml
V.B12(100mg/ml) <sup>j)</sup>	1ml	10ml/4hr	10ml/4hr
Thiamine(100mg/ml) <sup>k)</sup>	1ml	10ml/4hr	10ml/4hr
IPTG(0.5M) <sup>l)</sup>	1ml	-	-

※ <sup>A), B)</sup> 유가식 배양 방법의 생산성을 비교하기 위해서 동일한 조건에서 발효를 실시함.  
(같은 시간에 발효를 시작함으로써 온도, 습도, 조도 등의 주위환경을 동일하게 실시)

## I-3. 결과 및 고찰

### 3.1. 종배양

2시간 간격으로 sample을 취하여 UV-1201를 이용해 1~10배 희석하여 600nm에서 세포 농도(cell optical density)를 측정하였다. LB medium에 glucose나 glycerin을 첨가하거나 첨가하지 않은 경우에 크게 차이를 보이지 않았다. 또한, 24hr 동안 배양할 경우 1,3-PDO은 모두 생성하지 않았다. 균 성장은 4시간 이후에 급격하게 성장하다가 14시간 이후부터 성장 폭이 감소하였다. 따라서 종배양 (seed culture)의 최적 배양 시간은 12시간으로 하였다.

### 3.2. 1,3-propanediol의 분석

#### 3.2.1. 용매에 따른 분리 조건

기존의 1,3-propanediol (1,3-PDO)을 분석했던 방법<sup>24,25,26)</sup>을 응용하여 용매로 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하며, 유량을 1.0ml/min으로 혼합물을 분리 및 정성, 정량 분석하였다. 그러나 용매로써 황산을 사용할 경우에는 시료를 주입할 때마다 injector 부분의 filter의 오염으로 인해 잦은 filter의 교체가 초래하였으며, 컬럼의 수명을 단축시키는 문제를 야기했다. 용매로서 물을 사용할 경우에는 3개의 시료(fumaric acid, formic acid, lactic acid)을 제외하고는 정확하게 분리할 수 있었다. 따라서 적당한 용매로서 물을 사용하였다.

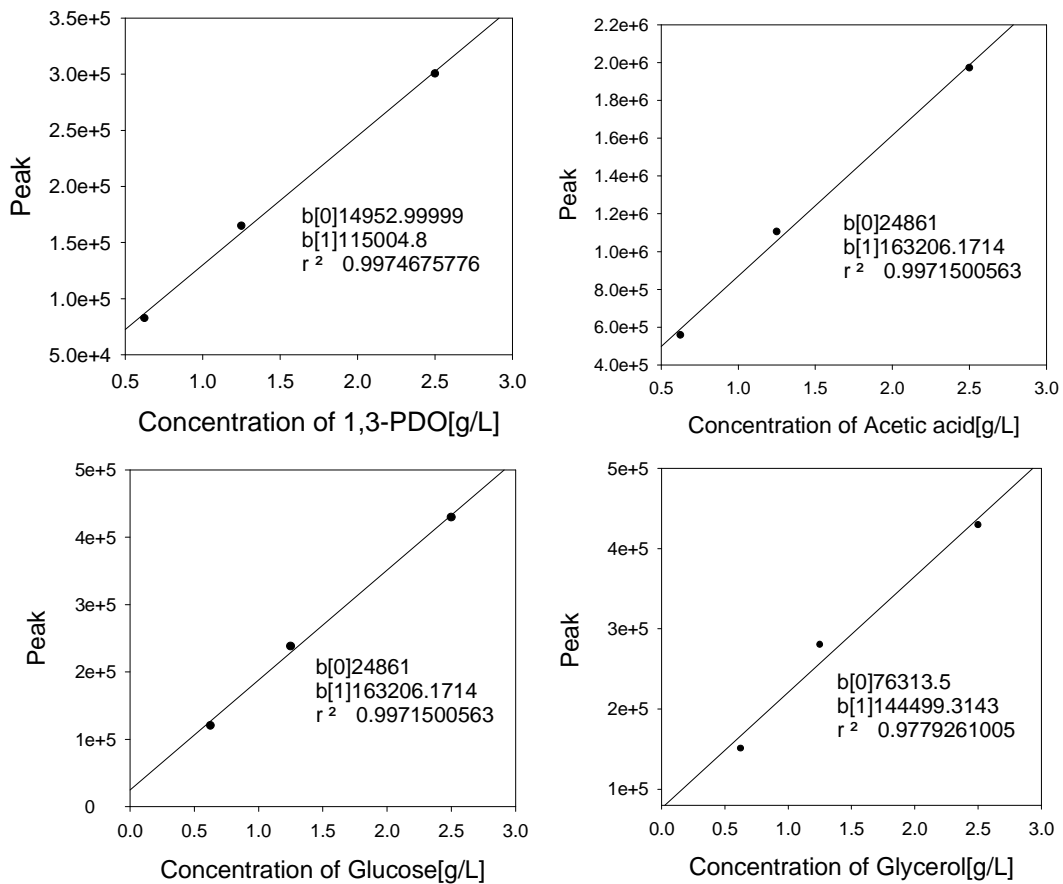
#### 3.2.2. 유량에 따른 분리 조건

유량에 따른 시료를 분석하기 위해 먼저, 0.8 ml/min으로 흘려보내어 혼합물을 분리 및 정성 분석하였다. 이 경우에는 분석시간(30min 정도)의 장기화를 초래하였다. 다음에 유량을 0.9 ml/min으로 할 경우에는 적당한 분석시간(15min 정도)을 얻을 수 있었다.

또한, 유량을 1.0 ml/min 이상으로 할 경우에는 HPLC 작동 시 칼럼의 압력이 4.5 atm 이상을 나타내어 SUGAR SH1011 (8mm ID × 300mm Length) 칼럼의 최대 압력이 5.0 atm으로 칼럼의 무리가 가므로 적당한 유량은 0.9 ml/min으로 선정하였다.

### 3.2.6. 검량선 작성

발효 배지 및 대사산물이 확실하게 분리된 glucose, glycerin, acetic acid, 1,3-PDO를 선정하여 검량선을 작성하였다(Figure 2).



**Figure 2.** Standard curve for the determination of 1,3-propanediol, acetic acid, glucose and glycerol concentration

### 3.3. 회분식 배양 공정 최적화

#### 3.3.1. 초기 탄소원 농도의 영향

초기 탄소원의 농도를 60 g/L로 시작했을 때 *E. coli*가 catabolite repression를 받기 때문에 세포의 성장이 저해되는 현상이 발생하여 오랜 성장 지연을 나타냈으나 glucose의 초기농도를 30 g/L로 한 경우 성장특성이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 세포성장에 적합한 glucose의 초기 농도는 20~30 g/L 정도가 적합한 것으로 나타났다.

#### 3.3.2. 회분식 발효 공정 개발

회분식 발효의 경우 초기 glucose 농도를 증가시키기 곤란하기 때문에 초기 glucose의 농도를 30 g/L로 시작하여 발효를 한 결과 세포농도는 발효 시작 8시간 정도까지는 지수 함수적으로 증가하다가 10시간 이후부터는 완만한 세포성장곡선을 보여주고 있다. 이러한 현상은 세포 성장이 glycerol 및 1,3-PDO 생산에 따라서 성장 저해를 받는 것으로 판단되며 이는 1,3-PDO의 생산에 불리한 점으로 작용할 것으로 예상된다.

### 3.4. 용존 산소의 영향

유가식 배양을 하기 위한 회분식 배양의 초기 조건은 세포 성장이 12시간 이전에 농축 배지를 공급하는 게 적당하므로 초기 탄소원의 농도를 30 g/L로 하여 회분식 발효를 실시한 후, 9시간 이후 농축 배지를 일정한 유량(4.6ml/hr)으로 공급하여 DO의 영향을 조사하였다.

그래프에서 알 수 있듯이 DO는 약 10% 이하로 유지하는 게 1,3-PDO의 생산성이 증가하였다. DO를 거의 limited 상태로 유지할 경우에는 cell의 성장이 상대적으로 적었으며, glycerin 및 1,3-PDO이 거의 생산되지 않았다(Figure 2 and Figure 3).

따라서 DO는 어느 정도 공급하는 게 나으므로 초기 교반 속도를 300rpm으로 하여 DO가 떨어지면 교반 속도를 올려 DO를 10~50% 정도 유지하는 게 적당하다.

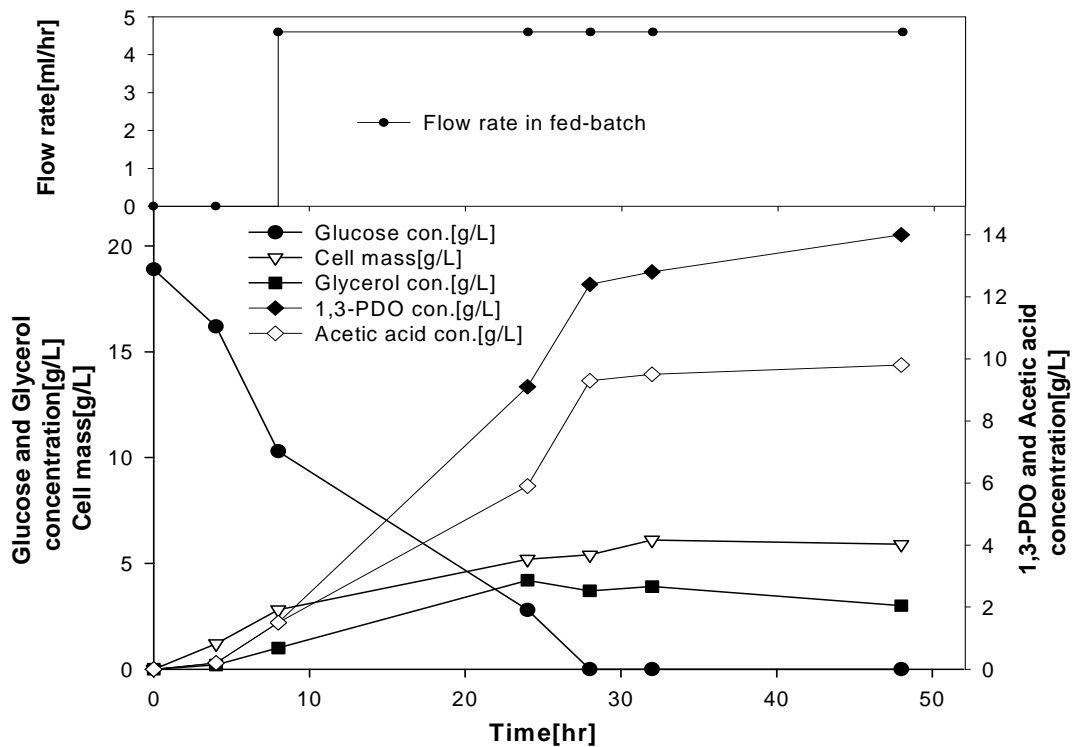
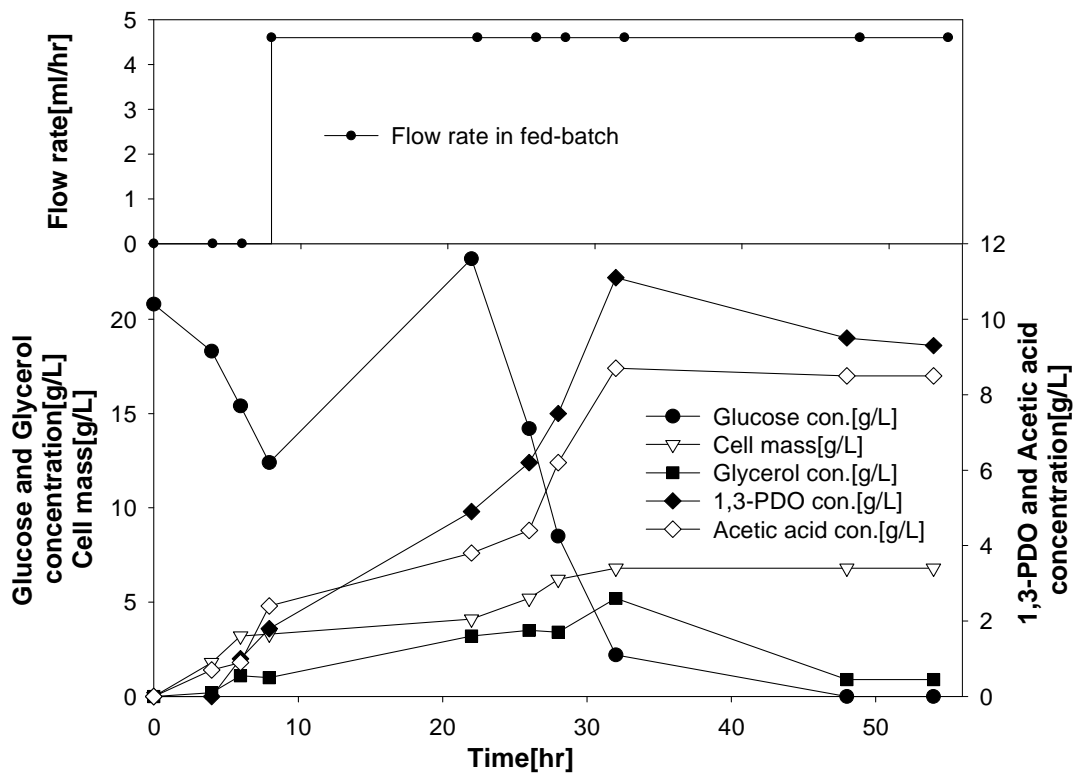


Figure 3. Effect of dissolved oxygen (DO) on 1,3-PDO production  
 DO level : about 10%



*Figure 4.* Effect of high level of DO on 1,3-PDO production  
DO level : over 40%



### 3.4. 유가식 배양 공정 최적화

#### 3.4.1. 유가식 배양 방법의 의한 1,3-PDO 생산성 비교

최적의 회분식 배양(초기 포도당의 농도 30 g/L, DO = 10~50 % 유지)을 하다가 12시간 만에 농축 배지를 공급하여 두 가지 유가식 배양 방법을 비교한 결과 1,3-PDO 생산량이 60시간 동안 유가식 배양을 했을 경우 pH-stat 방법으로는 36.1 g/L의 1,3-PDO를 생산하였으며, feedback control 방법으로는 42.4 g/L을 생산하여 pH-stat 방법에 비해 17.5 % 향상되었음을 측정할 수 있었다.

pH-stat 방법을 사용한 경우는 소모되는 NaOH 대비 glucose를 주입하여 glucose 농도를 제어가 가능하였으나, 세포의 성장이 18시간 이후 저해됨을 알 수 있었다. 이는 세포 성장이 glycerol과 1,3-PDO 생산에 따라 저해됨에 따라서 NaOH 요구량이 감소하여 glucose의 공급이 작게 되어 1,3-PDO 생산량도 낮아졌다.

반면에 feedback control 방법의 경우에는 실시간으로 glucose 농도를 충분히 공급하여 1,3-PDO 생산량이 60시간 동안 발효했을 경우 pH-stat방법으로 36.1 g/L이었지만, feedback control 방법으로는 42.4 g/L으로 향상되었다. 포도당의 유량을 너무 낮출 경우 탄소원 공급부족으로 인하여 1,3-PDO 생산 속도가 저하됨을 알 수 있었다(Figure 5~6, Table 2).

#### 3.4.2. 포도당의 농도의 조절

두 가지 유가식 배양 방법 중 1,3-PDO 생산성이 우수한 feedback control 방법을 채택하여 포도당의 농도를 조절하여 생산성 및 수율을 조사하였다.

먼저 포도당의 농도를 5g/L 정도로 유지하여 유가식 발효를 실시한 경우 18시간 이후부터 glycerol의 농도가 급격하게 증가하여 1,3-PDO으로 전환되지 못하고 축적되어 48시간에는 glycerol이 31.2 g/L까지 생성되며 1,3-PDO는 19.3 g/L까지 생산되었다. 발효가 더 진행된 60시간에는 glycerol은 1,3-PDO로 거의 전환되지 않고 계속적으로 소모되지 않고 39.5 g/L까지 증가 되며, 1,3-PDO는 20.2 g/L으로 12시간 동안 거의 생산되지 않았다. 이는 glycerol의 농도가 너무 높은 경우 glycerol이 1,3-PDO로 전환되지 못하는 것이다.

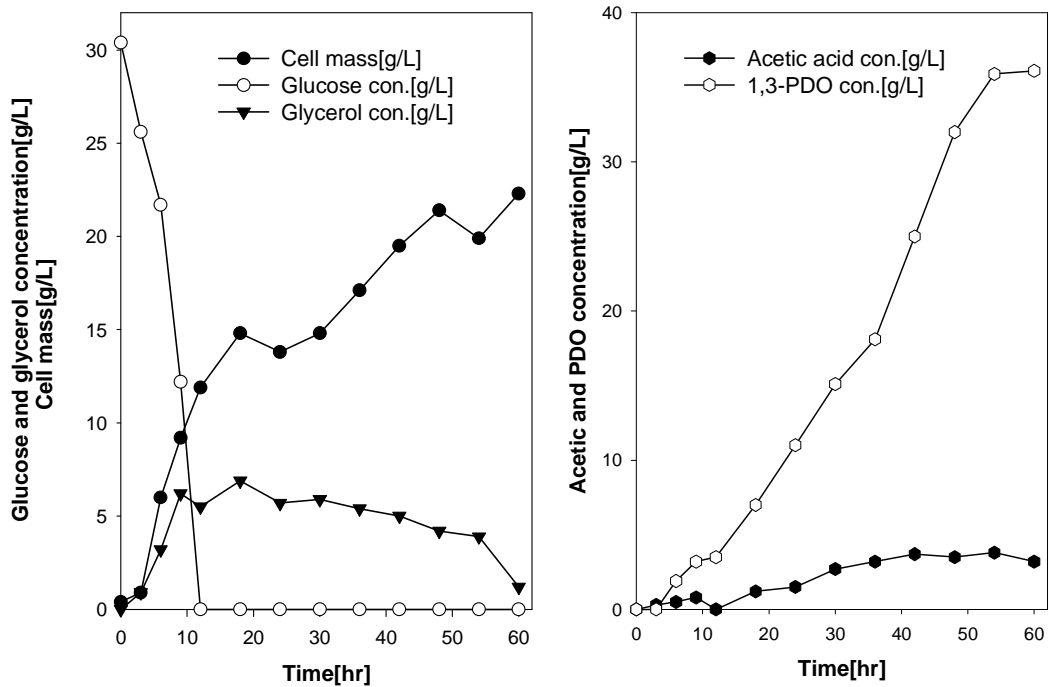
따라서 glycerol의 축적을 최소화하기 위해 glucose를 limited 상태로 공급하여 glycerol의 증가를 감소시켰다. Glucose의 농도를 거의 0에 가깝게 공급함으로써 12시간 이후부터 glycerol의 농도는 10.8 g/L에서 발효가 진행됨에 따라 계속적으로 감소하였으며 glycerol의 농도가 낮게 유지됨으로써 glycerol이 1,3-PDO로 전환되어 1,3-PDO는 계속적으로 증가하여 발효 60시간에는 glycerol이 모두 소모되며 39.0 g/L까지 생산되었다. Glucose의 농도를 5 g/L으로 유지했을 때 경우 1,3-PDO가 20.2 g/L 생산되었으므로 93.1% 향상되었다.

그러나 발효 48시간 이후부터 1,3-PDO의 생산성이 감소되는 것을 볼 수 있다. 이는 glucose를 거의 공급하지 않아 탄소원 공급 부족으로 인해 1,3-PDO 생산 속도가 저하되는 것으로 사료된다. 이에 탄소원인 glucose를 발효기에 조금씩 공급하게끔 glucose의 농도를 0~5 g/L으로 유지하면서 유가식 발효를 실시하였다. glucose의 농도를 0 g/L으로 유지하는 경우와 비슷하게 발효 12시간 이후부터 1,3-PDO는 계속적으로 증가하였으며 48시간 이후에는 상대적으로 탄소원인 glucose가 공급됨으로써 glycerol이 낮은 농도로 계속 존재함으로써 생산성이 향상되었다.

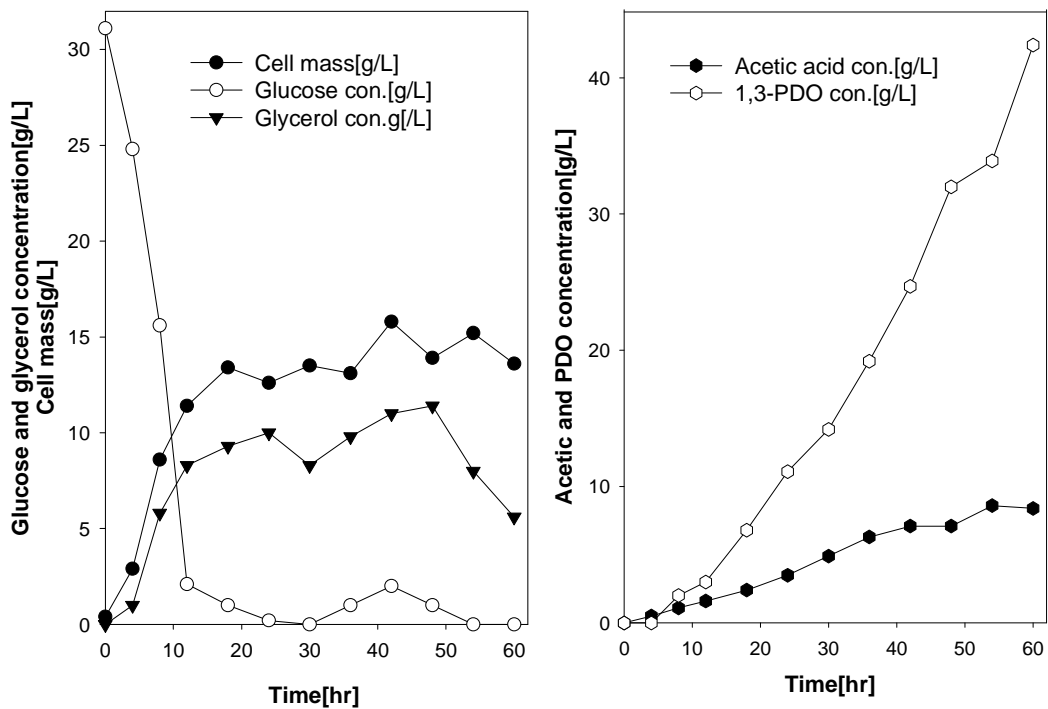
가장 적당한 glucose의 농도는 1,3-PDO의 생산성을 볼 때 glucose의 농도를 0~1 g/L으로 유지할 경우 60시간 이후에 1,3-PDO의 농도가 42.4 g/L으로 가장 좋았다. glucose의 농도를 0 g/L(limited)으로 할 경우에는 glucose의 농도가 모두 소모되므로 상대적으로 1,3-PDO 수율이 가장 높았지만, 1,3-PDO의 생산성은 포도당의 농도를 0~1 g/L으로 유지하는 경우보다 낮았다(Figure 7~9, Table 3).

### 3.4.3. 부산물의 대사경로를 제거한 균주배양

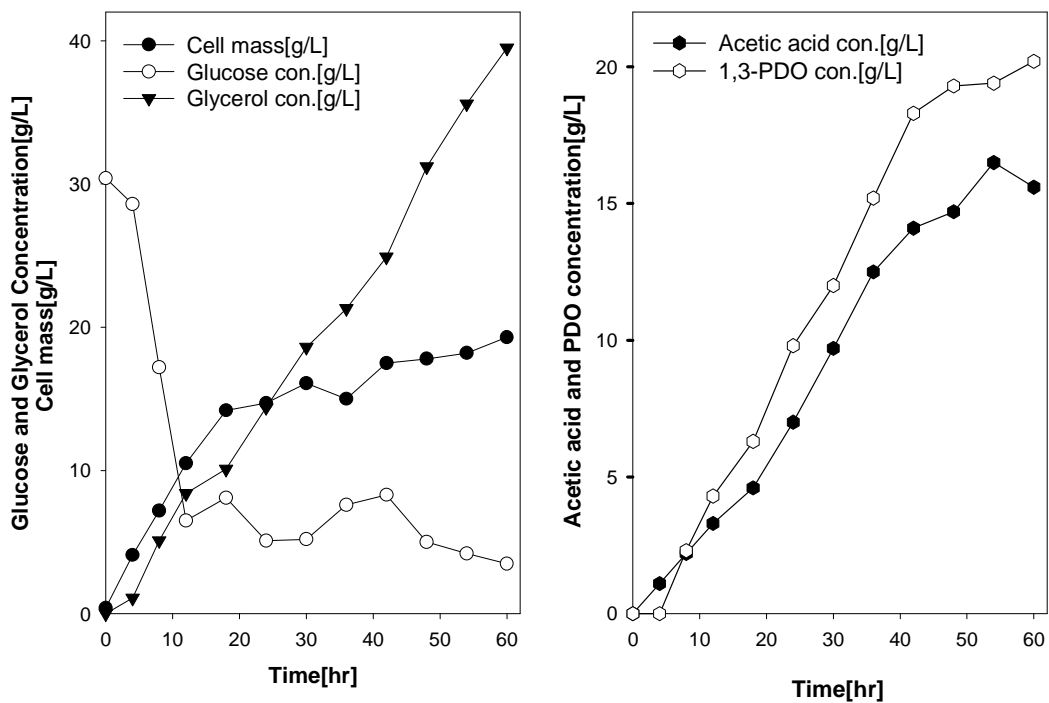
Byproduct 대사경로를 제거한 두 번째 균주를 이용한 1,3-PDO 생산 실험에서는 glucose 농도를 0~1 g/L로 유지하면서 발효를 수행하였다. 처음 균주와 달리 세포는 30.3 g/L까지 지속적으로 성장하였다. 발효 36시간에 glucose 1.1 g/L와 glycerol 8.0 g/L에서 6시간 이후인 42시간에 glucose는 2.2 g/L으로 증가하였으며, glycerol은 6.0 g/L으로 감소하였다. 이는 부산물인 유기산의 대사경로를 제거하여 Acetic acid의 농도가 감소하였지만, glucose가 glycerol로 전환하는 것과 glycerol이 1,3-PDO로 전환하는 것도 감소되는 문제점을 발생했다. 하지만 부산물의 생성을 억제함으로써 원균의 경우 수율이 pH-stat 31.5%, feedback control에서 포도당을 0 g/L으로 유지할 경우 34.1%보다 34.6%으로 향상되었다(Figure 10).



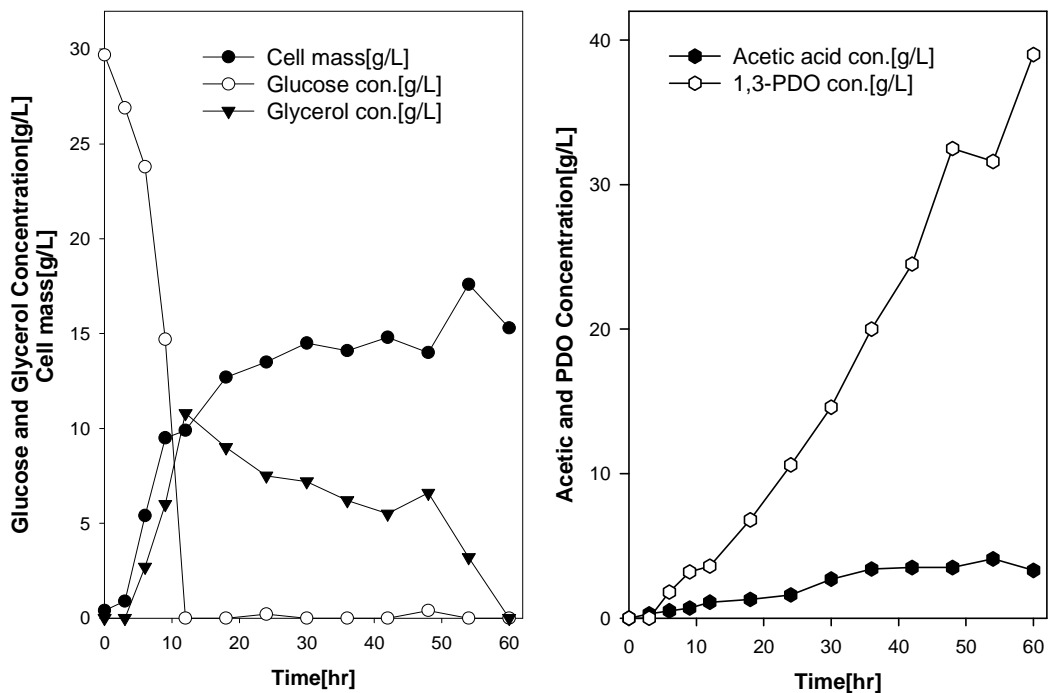
*Figure 5.* pH-stat : glucose and glycerol concentration, cell mass, 1,3-PDO and acetic acid concentration



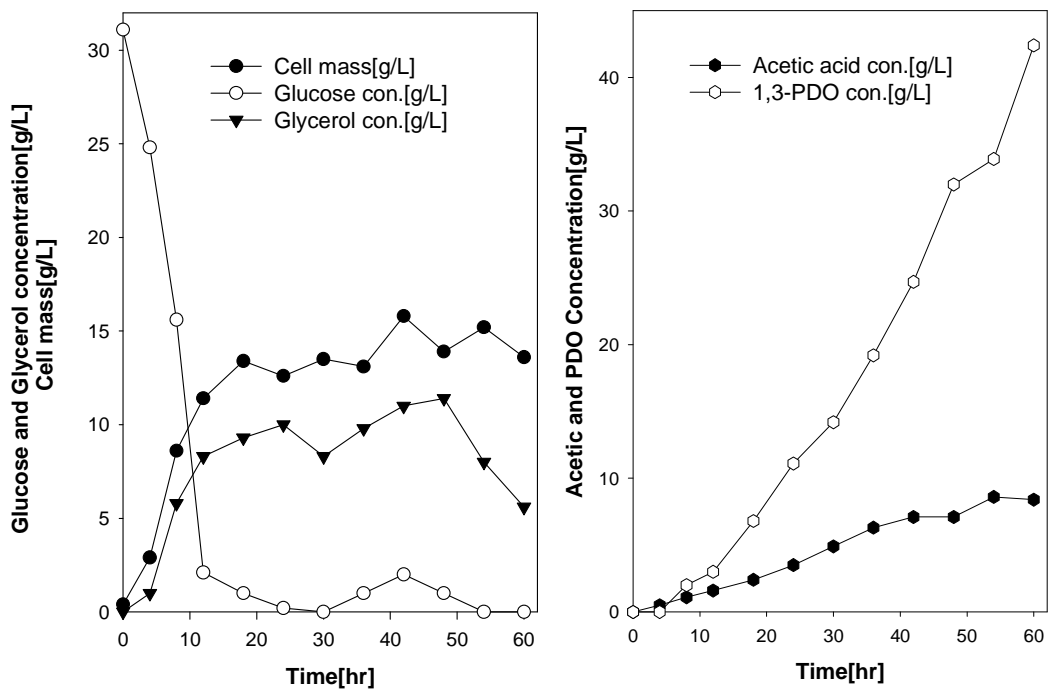
*Figure 6.* Effect of feedback glucose concentration level control on 1,3-PDO production



*Figure 7.* The change of 1,3-PDO production with feedback glucose concentration at 5g/L



*Figure 8.* The change of 1,3-PDO production with feedback glucose concentration at 0~1g/L



*Figure 9.* The change of 1,3-PDO production with limited glucose concentration

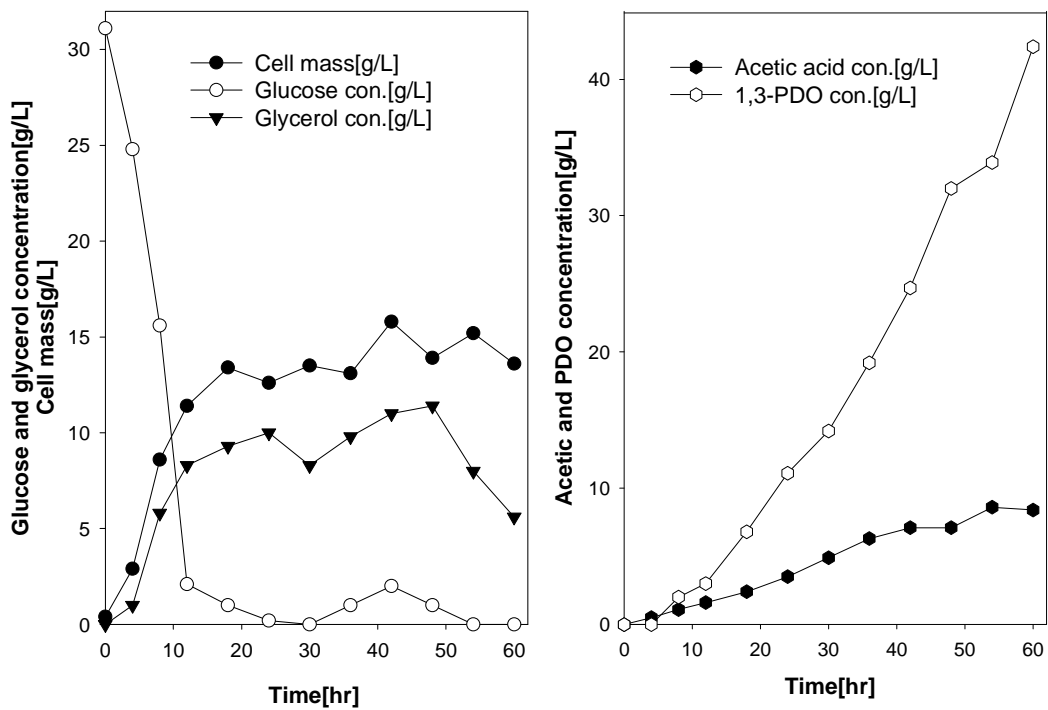


Figure 10. 1,3-PDO production with recombinant E. coli which was genetically modified to minimize organic acid production



*Table 2.* Effect of fed-batch operation methods on  
1,3-propanediol production

Fed-batch method	Glycerol con.[g/L] after 60hrs	1,3-PDO[g/L] after 60hrs	Acetic acid[g/L] after 60hrs	1,3-PDO yield[%]
pH-stat	1.2	36.1	3.2	31.5
Feedback control	5.6	42.4	8.4	28.7

**Table 3.** Effect of controlled glucose level on  
1,3-propanediol production

Controlled glucose level	Glycerol con.[g/L] after 60hrs	1,3-PDO[g/L] after 60hrs	Acetic acid[g/L] after 60hrs	1,3-PDO yield[%]
5 g/L	39.5	20.2	15.6	14.5
0~1 g/L	5.6	42.4	8.4	28.7
0 g/L (Glucose limited)	0.0	39.0	3.3	34.1

## I -4. 결론

본 연구에서는 두 가지 유가식 방법을 사용한 경우의 1,3-PDO 생산성을 비교 검토하였다. pH-stat 방법을 사용한 경우는 소모되는 NaOH 대비 포도당을 주입하여 포도당 농도를 제어가 가능하였으나 세포의 성장이 glycerol과 1,3-PDO 생산에 따라 세포성장이 저해됨에 따라서 NaOH 요구량이 감소하여 포도당의 공급이 작게 되어 1,3-PDO 생산량도 낮아졌다. 반면에 feedback control 방법의 경우에는 실시간 포도당 농도를 측정하여 유량을 조절함으로써 소모 대비 포도당 농도를 충분히 공급하여 1,3-PDO 생산량이 pH-stat 방법에 비해 17.5 % 향상되었음을 측정할 수 있었다.

원균(CJ-PDO)을 이용한 발효의 경우 42.4 g/L까지 1,3-PDO를 생산할 수 있었으며, 부산물의 대사경로를 제거한 균(CJ-U26)의 경우 acetic acid production은 현저히 감소시키고 성장은 지속적으로 일어났으나 glycerol 및 1,3-PDO 생산 속도도 동시에 감소되는 것으로 나타났으며 수율은 향상되었다. 두 균 모두 높은 농도의 1,3-PDO와 glycerol에 의해 세포성장과 1,3-PDO 생산이 저해를 받는 것으로 판단된다. 균주의 random mutation을 동시에 수행하여 균주의 1,3-PDO 내성을 향상시키는 방안의 추진이 필요하다. 또한, proteomics 분석을 통하여 재조합 및 환경변화에 따른 up-regulated 되는 enzyme과 down regulated 되는 enzyme profile을 관찰하여 1,3-PDO 합성속도를 증가시키는 전략이 필요하다.

## 제2장 유전자 재조합된 대장균을 이용한

### *Organophosphorus Hydrolase (OPH)* 생산공정 개발

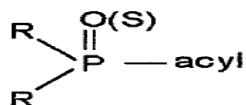
#### II-1. 서론

살충제(insecticides)는 농업 목적 뿐만 아니라 위생 방제 목적으로도 광범위하게 사용되어 왔다. 현재 약 200여 종의 농약이 등록되어 있으며 전체 농약의 사용량은 연간 25,844톤 (12.8톤/ha)이다.<sup>32-34</sup> 이 중 유기인계 살충제 (organophosphorus pesticides, OPPs)는 현재 우리나라에서 가장 많이 사용되고 있는 농약 중 하나이다. 비교적 저렴한 생산원가와 광범위한 살충효과 때문에 주로 사용되어 왔으나 환경에 대한 잔류성과 생물체내 축적성 때문에 1970년 초부터 사용이 금지되었다.<sup>35</sup> 그러나 이미 사용이 금지된 약품들의 경우 이전에 사용된 것이 우리 주위 환경에 잔류하여 악영향을 미치는 경우가 많다.<sup>36</sup>

유기인계 살충제는 주요한 신경전달물질인 아세틸콜린 (acetylcholine)을 가수분해하는 효소 아세틸콜린에스테라제 (acetylcholinesterase, AChE, EC 3.1.1.7) 활동을 억제 시킨다. 그리하여 아세틸콜린이 신경전달 역할을 수행하고 나서 분해되지 못하면 계속 축적되어 신경전달 수용체를 과잉 자극하게 되면 중추 및 말초신경에 이상을 나타내게 하므로 생물을 죽이거나 건강에 악영향을 미치게 된다.<sup>31,37</sup>

또한, 분자구조내에 phosphate group에 살충활성을 나타내는 벤젠고리와 ester bond를 이루고 있다.<sup>38</sup> 이들의 분해에 대한 연구는 생물학적 분해와 비생물학적 분해로 나눌 수 있다. 생물학적 분해에서 Richard 등<sup>39</sup>은 carboxylesterase isozyme을 가지는 특정 미생물을 이용하였고, Gary 등<sup>40</sup>은 곰팡이를 Robertson 등<sup>41</sup>은 토양 중 박테리아를 이용하여 유기인계 살충제를 분해한다고 보고하였으며, Heng 등<sup>42</sup>은 elm tree를 이용한 phytoremediation으로 chlorpyrifos를 분해한다고 보고한 바 있다. 비생물학적 분해에서 Mamoru 등<sup>43</sup>은 수중에서 humic substance들에 의한 광촉매효과에 의한 분해를 보고했으며, Li 등<sup>44</sup>은 효율성을 높이기 위해 새롭게 합성한 nanosize의 광촉매 TiO<sub>2</sub>를 사용하여 유기인계 살충제의 분해에 대한 연구를 수행하였으며, 이들은 공통적으로 가수분해 반응을 유도하여 벤젠고리와 phosphate group을 형성한다고 밝혔다<sup>45</sup>.

유기인계 유기 화합물은 1943년 D. Jerchel이 살충효과가 있다고 처음으로 보고된 이래 지금까지 10만개 이상의 화합물이 검색되었다. 유기인계 살충제의 구조는 5가의 인이 중심이 되고 이 인에 이중결합을 가진 산소 또는 황이 결합되며 R는 알콕시, 알킬, 및 아마이드기이며 아실측은 무기 또는 유기산의 잔기가 결합되어 있다. (Scheme 1)<sup>27~30)</sup>



Scheme 1

유기인산 화합물 (organophosphorus compounds)을 분해시키는 대표적인 3가지 형태의 효소는 OPH, OPPA-1, OPPA-2이다.

첫 번째 효소는 organophosphorus acid hydrolase (OPH), 또는 phosphotriesterase라 불리는데, 그 효소는 *Pseudomonas diminuta* MG와 *Flavobacterium* sp. strain (ATCC 27551) 으로부터 발견되었다.<sup>46~50)</sup> 이 효소는 325개의 아미노산으로 구성된 35 kDa의 분자량을 가진 단백질로, 1~2개의 아연 또는 코발트이온을 가지고 있는 금속효소(metallocoenzyme)이며 paraoxon, DFP, soman, sarin, tabun등을 분해할 수 있다.<sup>50)</sup>

두 번째 효소는 organophosphorus acid anhydrolase (OPAA), 일명 OPAA-2라 불리는데, 이 효소는 *Alteromonas* sp. strain JD6.5로부터 발견되었다.<sup>51,52)</sup> 이 효소도 OPH와 마찬가지로 paraoxon, DEP, soman, sarin, tabun을 다 같이 분해시킬 수 있다. 그러나 OPAA-2는 OPH보다 soman 분해능력이 더 큰 반면, OPH는 OPAA-2보다 paraoxon 분해능력이 더 크다.<sup>52~54)</sup>

세 번째 효소는 *Alteromonas undina*<sup>55)</sup>와 *Alteromonas haloplankis* C로부터 발견된<sup>56)</sup> OPA anhydrolase인데 이 효소는 OPPA-2와 유사한 성질을 가지고 있으며, *Alteromonas haloplankis* C (ATCC 23821)로부터 발견된 OPAA 효소는 원래 포롤린 (proline) 잔기가 카르복실기 말단에 위치한 dipeptide, 즉 X-Pro의 펩타이드결합 (peptide bond)을 가수분해하는 활성을 가진 prolidase로 알려져 있다.<sup>57,58)</sup>

이 중 본 연구에서는 유기인산 화합물을 분해하는 효소 중 OPH에 관해 시작하였다.

*pseudomonas diminuta*나 *flavobacterium sp.* 등의 미생물이 유기인을 분해할 수 있는 효소인 OPH (organophosphorus hydrolases)를 만들어내는 것으로 알려져 있으며 이들 효소가 다양한 종류의 유기인 화합물을 높은 전환속도로 분해하므로 이를 이용 하려는 연구가 주목을 받고 있다. 그러나 위의 *pseudomonas*나 *flavobacterium*의 경우 고농도 배양이 어려워 실제 공정차원에 적용하는 데 문제점을 가지고 있으므로 OPH 유전자를 가진 재조합 대장균을 이용하여 이를 해결하려는 시도가 이루어지고 있다. 하지만 대장균 내에서는 유기인 분해효소의 가용성이 낮아 생산수율이 상대적으로 떨어지는 단점이 있다. 현재까지 이러한 재조합 대장균 시스템의 문제를 해결하기 위해 몇 개의 유전자 중합체를 발현하는 방법, 가용성 단백질과의 융합체를 만들어 발현하는 방법, 그리고 세포질이 아닌 세포 표면에 유기인 분해효소를 발현시키는 방법 등이 시도되어 왔다.

본 연구에서는 OPH 유전자를 가진 재조합 대장균을 이용하여 유가식 배양 공정을 통해 유기인을 분해할 수 있는 효소인 OPH 생산을 증가시키려는데 목적이 있다.

본 연구에서 사용할 OPH는 토양미생물인 *pseudomonas diminuta*와 *flavobacteria sp.*에서 유래되었으며,<sup>59)</sup> 농약과 신경가스 등으로 이용되는 유기인의 가수분해에 매우 높은 효율을 나타냈다.<sup>60)</sup> 또한, 가수분해된 생성물은 독성이 처음 독성에 비해 매우 많이 줄어든다. 따라서 본 연구에서는 재조합 DNA 기술을 이용하여 분해하는 효소인 OPH의 유전자를 대장균시스템에서 발현하고 이를 이용하여 토양이나 수계에 잔류하고 있는 유기인들을 환경친화적으로 분해, 제거하는 기술을 연구하고자 하였다.

OPH는 유기인산 화합물 (organophosphorus compounds. OPs)을 가수 분해의 촉매 작용으로 합성되며, 토양의 박테리아 *pseudomonas diminuta*로부터 분리되는 2분자체 (이핵)의 매우 유독한 금속효소이다. 또한, organophosphorus hydrolases (OPH; E.C. 3.1.8.1)로 분류된다. 그들은 극심한 독성 때문에, 농약 중 유기인 화합물계의살충제 및 화학적 신경제 (chemical warfare agents)로 사용했다.<sup>61-63)</sup> OPH는 *p. diminuta* 으로부터 재조합 플라스미드에 유전인자(opd)를 연결하여 발견되었다. DNA 순서는 유전인자 (opd)에 의해 결정되며, 유전자(opd)들은 숙주 종의 promoters를 일치시키고 있는 벡터들의 여러 가지 형태에서 발현시켰다.<sup>64)</sup>

OPH의 기본은 bioremediation[바이오레메데이션. 미생물분해. 생물정화] 시스템으로 유기화합물의 독성을 급속하게 제거할 뿐만 아니라, 환경 친화적이다.<sup>65)</sup>

Bioremediation은 미생물이나 식물체를 사용하여 오염물질을 전환하거나 분해함으로써 오염된 토양이나 지하수를 정화하는 것을 의미한다. 특히 in situ bioremediation은 오염지역에서 오염물질을 제거하기 위해 토착 미생물의 분해효율을 향상시키거나 활성이 우수한 미생물을 첨가함으로써 분해효율을 향상시키는 방법이다.

OPH의 사용은 토양의 생물 정화로써 많은 잠재성을 가지며, 정화 공정은 유독한 유기화합물에 과다하게 노출시키기 위한 것이다.<sup>66,67)</sup> 표면으로 생산하는 OPH와 순수한 OPH 모든 세포 (Cells)는 결과적으로 로지스틱한 부담을 두드러지게 줄이게 되었다. OPH의 대량 생산 및 구성은 유독한 유기화합물의 바이오레메디이션의 발전에 있어서의 제일 중요한 과정이다.<sup>68-72)</sup>

OPH를 생산하기 위한 재조합 대장균은 여러 종류의 유기화합물을 변형시켜 개발되었다.<sup>73-75)</sup> 그러나, 재조합된 대장균의 OPH 생산 수율은 낮았다.<sup>76,77)</sup> OPH를 생산 수율이나 생축매의 효율을 개량하기 위해서는 몇 개의 유전자를 삽입하는 방법, 가용성 부분의 용해도를 증가시키는 방법, *Vitreoscilla hemoglobion* (VHb, 박테리아 헤모글로빈의 일종)에 동시 발현하는 방법, 세포 표면에 발현시키는 방법 등이 시도되어 왔다.<sup>78,79)</sup>

재조합 단백질의 숙주 세포를 발현시킨 재조합 대장균으로써 OPH를 과잉 생산하기 위한 많은 노력들이 진행되어 왔다. 기존의 *Omburo*<sup>76)</sup> 등은 대장균을 발현시켜 활성도는 69 U/mg이었다. Serdar과 Murdock<sup>69)</sup>은 재조합 대장균 30°C에서 배양했을 경우 OPH의 농도는 39 mg/L이었으며, OPH의 활성도는 59 U/mg이었다. *Bacillus subtilis*는 OPH와 유사한 MPH(methyl parathion hyrolase)을 생산하며, 활성도는 28 U/ml이었다.<sup>81)</sup> Srinivasan과 Barnard<sup>65)</sup> 등은 *Ralstonia eutropha*을 이용하여 높은 농도의 OPH를 생산할 수 있었다고 보고하였으며, *R. eutropha*으로부터 total cell mass의 약 10% OPH를 생산할 수 있었지만, GRAS 미생물을 사용하여 대장균을 제작했을 경우 OPH의 농도는 매우 낮았으므로, 발효 공정 개발을 통한 OPH 생산을 증가시키는 것이 필요하다.

최근에는 재조합 대장균을 통해 extra cellular (세포외로 분비되는) OPH의 생산을 발견했다. 본 연구에서는 유가식 발효 공정을 통한 포도당의 농도와 induction (발현 개시제)를 조절하여 세포 성장과 intra cellular OPH 및 extra cellular OPH를 분석하여 OPH 최적 생산 조건을 찾고자 하였다.

## II-2. 재료 및 방법

### 2.1 시약 및 기기

본 실험에서는 Fisher Scientific (Tustin, CA, USA)으로부터 yeast extract,  $K_2HPO_4$ ,  $H_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  and  $NaH_2PO_4$ 을 구입하여 이용하였으며, J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서  $NH_4Cl$ 을 구입하여 사용하였다. TSB medium (tryptone 15g, soytone 5g, sodium chloride 5g)은 Becton Dickinson(Sparks, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. OPH의 활성도는 측정하기 위해 Aldrich(Milwaukee, WI, USA)으로부터 paraoxon과 p-nitrophenol을 구입하여 사용하였다.

그리고 세포파괴용으로 Sonic Dismemberator (Fisher 100 model)을 사용하였으며, 1차원 전기영동장치로는 Mini electrophoresis (Bio-rad)를 사용하였고, 2차원 전기영동장치로는 Ettan IPG Isoelectric Focusing Unit (Amersham biosciences)을 사용하였다. 세포 분리용으로 Micro centrifuge (한국 한일과학)을, 단백질 분리 및 농축용으로 High speed centrifuge (한국 한일과학)을 사용하였다.

세포의 농도를 측정하기 위해 분광광도계 (Shimadzu, UV-1201)를 이용하였으며, 포도당의 농도를 측정하기 위해 3,5-dinitrosalicylic acid (New Jersey, USA), potassium sodium tartrate (롯데염, Rochell Salt, 동양과학), sodium hydroxide (NaOH, 동양과학) 및 Heater (Fisher Scientific)을 사용하였다.

### 2.2 균주 및 보관

본 연구에서 사용한 균주는 유전자 재조합된 균주인 *E. coli*을 사용하였으며, LB agar plate (영양고체 배지, yeast extract 5g/L, peptone 10g/L, NaCl 10g/L, agar 20g/L)에서 37°C에서 150rpm에서 배양하여 long-term stock solution (배양액 1ml를 취하여 12,000rpm에서 10min간 원심분리를 거친 후 상등액을 버리고 0.9 % NaCl 용액 1ml를 넣고 잘 섞어준다. 세척과정을 2회 거쳐 순수한 세포만 취한 후 0.2ml의 LB medium을 첨가하고, 50% glycerol 0.8ml를 넣고 잘 교반해 준다)으로 제작하여 -70°C에 보관하며 종 배양에 사용하였다.



## 2.3. 발효 조건 및 배양 방법

### 2.3.1. 균주 배양

대장균(*E. coli* pET22b)<sup>87)</sup>을 이용한 OPH를 생산하기 위한 최소 배지인 12.8 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L NaCl, 1 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3 mg/L  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ 에 추가적으로 0.3~0.5 % (w/v) glucose, 50 mg/ml ampicillin, 0.1 mM  $\text{CoCl}_2$  첨가하여 배양하였다.

### 2.3.2. 종 배양

회분식 배양을 위한 종 배양은 300ml 삼각플라스크 2개에 각각 100ml의 배지를 넣고 121°C에서 15분간 멸균 시켰다. 그런 다음 100ml 배지에 항생제인 Ampicillin (50mg/ml, Duchefa사) 0.1ml를 넣은 후 종균을 접종하고 37°C에서 250rpm으로 교반시키면서 배양하여 세포 농도가 기하급수적으로 증가할 때 본 발효기에 접종하였다.

### 2.3.3. 회분식 배양

발효기는 DO-센서와 pH-센서를 장착한 KF-5L의 한국발효기를 이용하여 냉각수를 순환하여 장동온도 조절이 가능하도록 하였고, autoclave를 사용하여 121°C에서 15min 동안 멸균처리한 후 발효시켰다. 종배양액 접종 전 pH는 8N-NaOH와 1N-HCl로 6.8으로 조절하였으며, 교반속도는 300~600rpm으로 DO를 50% 이하로 유지시켜 주었다. 또한 온도는 37°C로 했다. 2시간 정도 안정화시킨 후, 37°C에서 12시간 동안 배양한 종배양액 200ml를 1.8L에 배양액에 접종하여 배양하였으며, 분석을 위한 시료는 sampling port를 통해 채취하였다.

### 2.3.4. 유가식 배양

여러 가지 유가식 배양공정 중 feedback control method를 채택하였다. 초기에 용존 산소량을 50% 이하로 조절하면서 회분식 배양을 수행하다가 cell mass가 기하급수적으로 증가할 경우 농축된 배지를 공급하여 glucose의 농도를 유지시켜 주었다.

## 2.4. 분석 방법

### 2.4.1. 발현개시제의 효과

50ml tube에 배양하여 OPH 생산에서 inducer의 효과를 수행하였다. LB broth (영양배지. yeast extract 5g/L, peptone 10g/L, NaCl 10g/L)에서 배양하여 세포 농도(cell optical density)가 0.9이면, 1M IPTG(Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside. Duchefa사) 0.2 $\mu$ l을 첨가한 후 4시간 동안 배양한 후 10ml 배양액을 취하여 단백질 발현 및 OPH 생산을 알아보았다. Inducer를 넣기 전과 넣은 후 샘플을 취하여 SDS-PAGE 전기영동 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis) 장치를 통해 단백질 발현을 확인하였으며, pET22b harboring 대장균 (*E.coli*)으로부터 생산된 세포를 정제한 세포 침전물을 inducer인 IPTG의 넣기 전과 넣은 후 OPH 활성도를 측정하여 OPH 생산을 비교하였다.

### 2.4.2. 배양액 분석

분석을 위한 시료는 일정시간(2~6hr)마다 10ml(5ml $\times$ 2)씩 취한 후, 5ml 배양액은 냉동보관 하였으며, 나머지 5ml 배양액을 이용하여 세포 농도 및 포도당 농도와 OPH 활성도를 측정 및 분석하였다.

### 2.4.3. 세포 농도

균체량은 1~50배 희석하여 600nm에서 Cell O.D를 분광광도계(Spectrophotometer)를 사용하여 측정하였다. Cell O.D (600nm)와 Cell mass (g/L)의 검량선을 작성 (Figure 11) 하여, 발효시에는 Cell O.D만 측정하여 Cell mass로 환산하였다

### 2.4.4. 포도당의 농도

포도당의 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 측정하였다.<sup>90)</sup> 발색제인 DNS 용액은 3,5-dinitrosalicylic acid (New Jersey. USA) 1g, potassium sodium tartrate (Rochell Salt. 동양과학) 150g, sodium hydroxide (NaOH. 동양과학) 8g을 증류수 500ml로 조제하여 사용하였다. 일정한 시간 간격으로 sampling하여 냉동(-20 $^{\circ}$ C) 보관한 sample을 냉장(4 $^{\circ}$ C)에서 완전하게 녹인 후 sample 1ml만 취한다. 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm, 10min동안 원심 분리하여 상등액만 얻어 포도당의 농도를 측정하였다.

Glucose 1g/L을 이용하여 검량선을 작성 (Figure 13) 하며, 배양액은 50~200배 희석하여 540nm에서 흡광도(ABS)를 측정하여 포도당의 농도로 환산하였다.

#### 2.4.5. OPH의 활성화도 측정

OPH의 활성화도는 일정한 시간 간격으로 sampling한 sample을 cell과 solution을 분리하여 측정하였으며, 발효가 완전하게 종료된 sample은 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

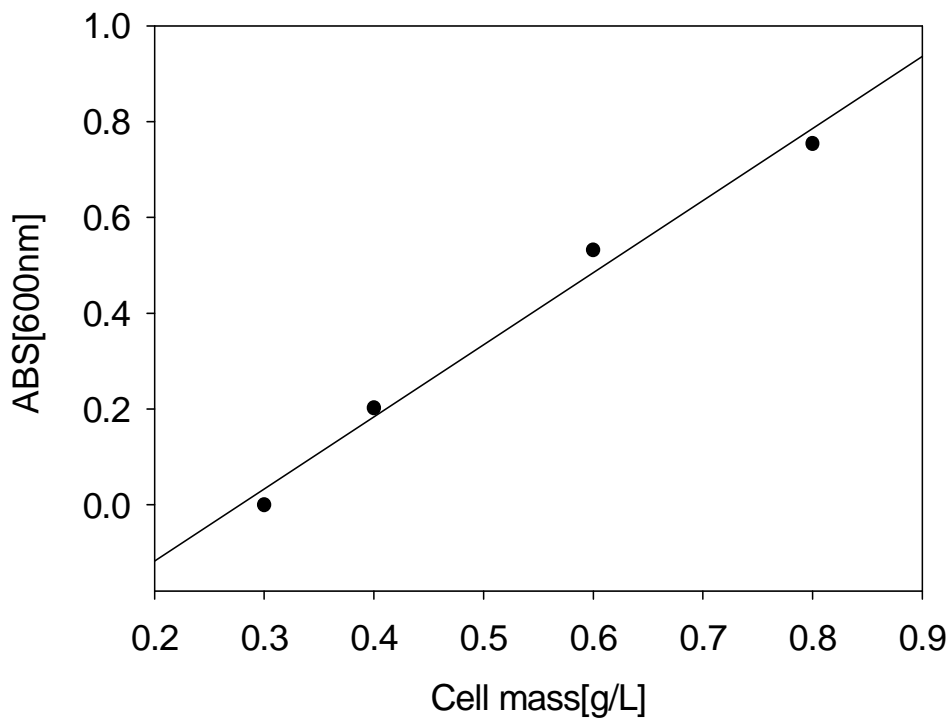
일정한 시간 간격으로 sampling하여 냉동(-20℃) 보관한 sample을 냉장(4℃)에서 완전하게 녹인 후, 4℃에서 12,000rpm, 10min동안 원심 분리하여 sample 1ml만 취하여 Table 4와 같은 순서로 분석하였다.

#### 2.4.6. OPH의 세포 침전물(Total cell lysate)

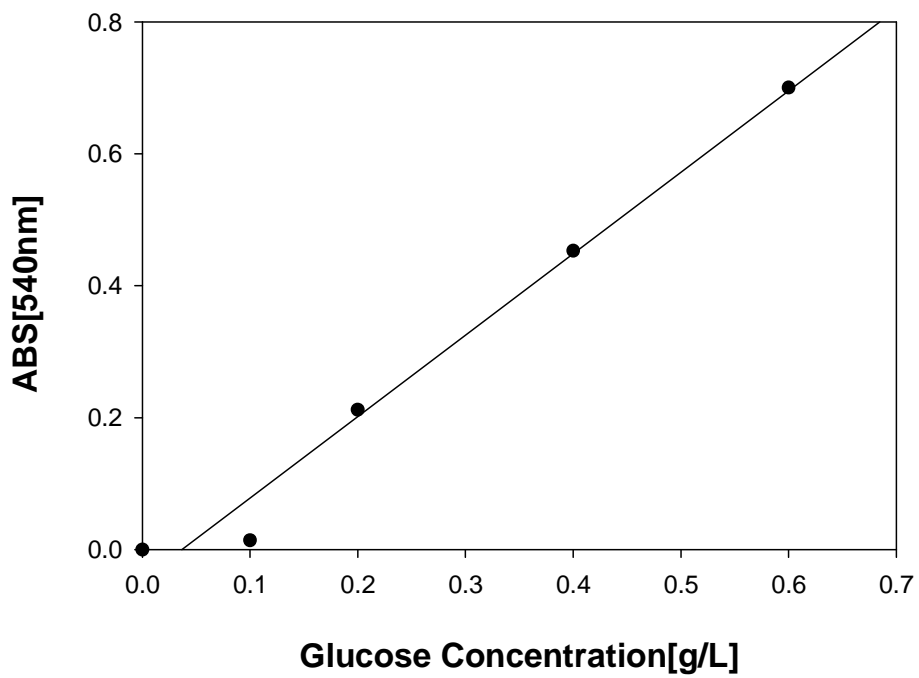
재조합 균주인 대장균 (*E. coli* pET22b)의 OPH 생산 효소 발현을 확인하기 위해 세포 정제는 다음과 같이 하였다. 먼저, 1.5ml tube에 sample 1ml를 취하여 Voltex Mixer로 충분히 섞어 준 후 고속 원심분리기로 4℃, 12,000rpm에서 15min 동안 원심분리시킨다. 상등액은 버리고 남은 세포는 0.1ml phosphate-buffered saline (PBS)을 넣은 후 초음파 파쇄기 (Sonic Dismemberator, Fisher 100 mode)를 이용하여 2초 동안 30번을 실시하여 total cell lysate을 얻었다.

#### 2.4.7. OPH 생산 효소 발현 확인

정제된 세포 침전물을 각각 회수하여 실험에 사용하였다. 전기영동은 10% separating gel과 5 % stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 진행하였다(Table 5). 단백질과 5배 희석된 SDS sample buffer (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.5 % glycerol, 2 % SDS, 14.4mM β-mercaptoethanol, 0.1 % bromophenol blue)를 혼합하여 100℃에서 7분간 중탕한 후 protein marker (prestained protein ladder, Fermentas)와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동 된 gel은 CBB (Coomassie brilliant blue R250, Sigma, St. Louis, MO, USA) 염색약으로 염색하고 탈색용액으로 탈색반응 시킴으로써 원하는 단백질의 유무를 확인하였다.



*Figure 11.* Standard curve for the determination of cell mass with cell optical density (600nm)



*Figure 12.* Standard curve for the determination of glucose concentration

**Table 4.** Organophosphorus hydrolase activity measurement protocol

- 
- ① sample 1ml을 4℃, 12,000rpm, 10min동안 원심 분리시켜 cell과 solution을 분리한다.
  - ㉠ 1.5ml tube에 Solution 0.1ml를 취한다.
  - ㉡ 나머지 solution을 버리고 40mM Tris-HCl(pH=8.0) 1ml에 Cell을 완전히 용해시켜 0.1ml를 취한다.
  
  - ② 각각 Cell(intral cellular OPH)과 solution(extra cellular OPH)에 250mM CHES(2-(N-cyclohexylamino)ethane-sulfonic acid.(pH=9.0)) 0.4ml를 넣는다.
  - ③ 그런 후 각각 1mM paraoxon(Sigma. St. Louis. MO. USA) 0.1ml를 넣는다.
  
  - ④ 0.4ml의 증류수를 넣고 5min 동안 발색(노란색) 시킨다.
  
  - ⑤ 분광흡도계(UV-1201)를 이용하여 400nm에서 흡광도를 측정한다.
  
  - ⑥ 검량선을 이용하여 OPH의 활성도[unit]를 계산하였다.
- 

※ 효소의 활성은 상온에서 1분 동안 1 $\mu$ mol p-nitrophenol를 생산하는데 관여하는 효소의 양을 1unit로 환산하였다.<sup>82)</sup>

## II-3. 결과 및 고찰

### 3.1 OPH 생산을 위한 inducer의 효과

Inducer를 넣기 전과 넣은 후 샘플을 취하여 SDS-PAGE 전기영동 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis) 장치를 통해 단백질 발현을 확인하였으며, pET22b harboring 대장균 (*E.coli*)으로부터 생산된 세포를 정제한 세포 침전물을 inducer인 IPTG의 넣기 전과 넣은 후 OPH 활성도를 측정하여 OPH 생산을 비교하였다.

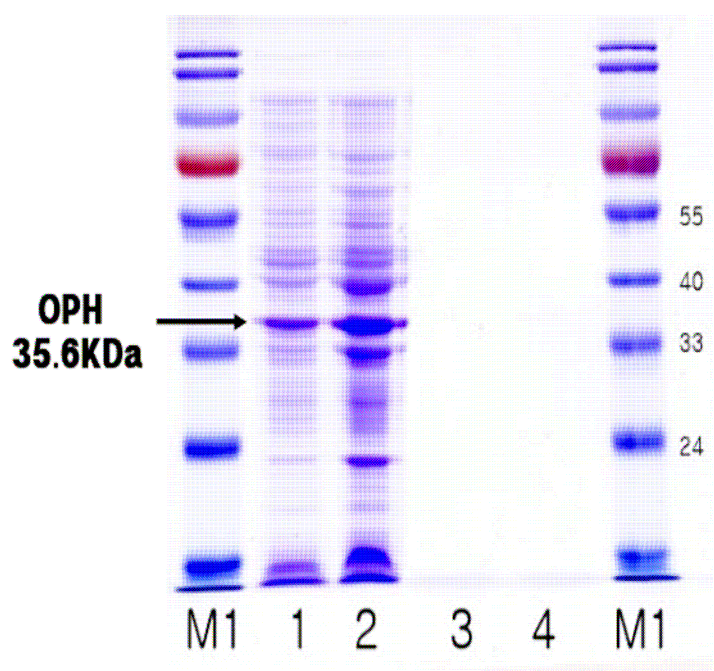
Inducer를 넣은 후, 유전자 (opd) 구조의 발현 증가 결과는 OPH 생산 증가를 암시한다. Intra cellular OPH는 IPTG 첨가 없이도 측정되었으며, IPTG 첨가시 IPTG 첨가하지 않은 경우보다 OPH의 활성도는 증가되었다. 50ml tube로 배양시 extra cellular OPH 및 세포 농도가 너무 낮아 단백질 발현 밴드를 IPTG 넣기 전과 IPTG 넣은 후 모두 관찰할 수 없었다(Figure 13).

OPH 생산에 있어서 inducer인 IPTG의 영향은 매우 제한적이었다. OPH는 IPTG 없이도 생산되었고 IPTG 첨가에 의해 더 많이 생산되었다. 경제적 관점에서 오히려 IPTG 없이 재조합 OPH를 생산하는 게 효율적이다.

### 3.2 발효 시간에 따른 OPH 생산

pET22b harboring 대장균(*E. coli*)으로부터 생산된 세포를 정제한 세포 침전물을 다양하게 OPH 활성도 및 단백질 발현을 측정하였다. 본 실험결과 복제된 DNA<sup>19)</sup> 안에서 promoter에 의해 우리가 원하는 유전자(opd)의 단백질을 정확히 발현하고 있음을 보여 주었다. 재조합 균주에서 발현된 단백질이 수용성인지 불용성인지 확인하기 위하여 sonicator를 이용하여 세포벽을 파쇄하고 세포 내 단백질을 추출하여 수용성인 상등액 부분과 불용성인 세포 침전물을 분리 회수하여 SDS-PAGE 상에서 확인한 결과 Figure 15와 같았다.

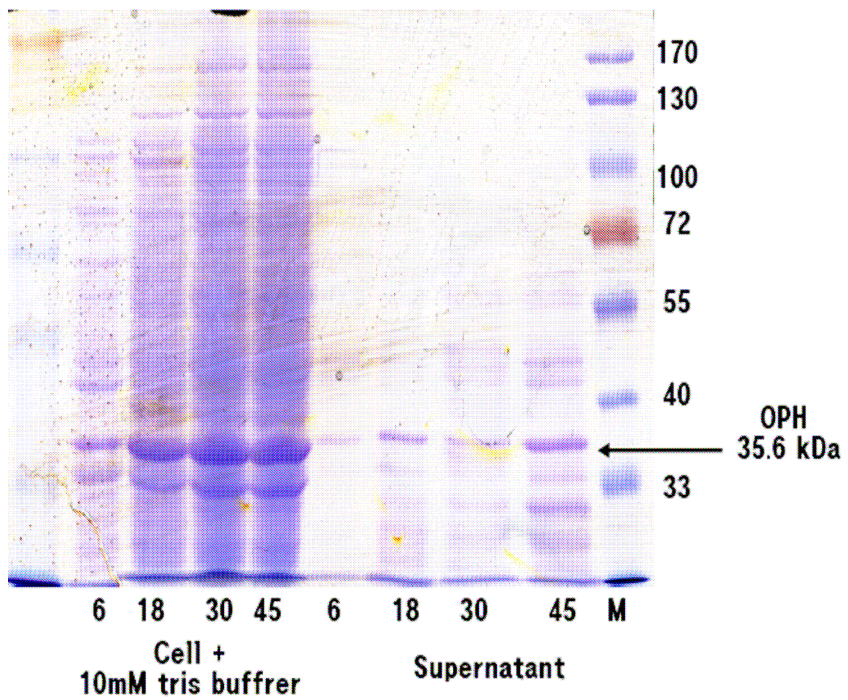
이는 extra cellular OPH 농도는 회분식 배양에서 발효 시간이 증가함에 따라 증가하지만, intra cellular OPH 농도보다 작음을 알 수 있다.



- M1 : molecular weight marker
- 1 : Cell extract before induction
- 2 : Cell extract after induction
- 3 : Supernatant before induction
- 4 : supernatant after induction

**Figure 13.** SDS-PAGE analysis of before and after addition of inducer. Separated by SDS-PAGE with a 10% gel under equal condition. Positions of molecular size markers are shown in kilodaltons.





**Figure 14.** SDS-PAGE analysis of fermentation samples.

Separated by SDS-PAGE with a 10% gel under equal condition.

The figure shows the time course of OPH production.

### 3.3 초기 포도당 농도의 영향

세포 성장과 OPH 생산에서 초기 포도당의 농도의 영향을 조사하기 위해 초기 포도당의 농도를 다르게 하여 회분식 배양을 수행하였다. 초기 포도당의 농도를 60 g/L로 배양한 경우 1,3-PDO 생산과 다르게 높은 포도당의 농도에 의해 기질 저해를 받지 않고 세포는 성장하였지만, OPH는 크게 저해되었다. 이는 세포가 성장함에 따라 유기산 및 대사물질을 생산함으로써 OPH 농도를 감소시키는 것으로 판단된다.

초기 포도당의 농도를 30 g/L으로 하였을 때, 14시간 후의 OPH의 활성도는  $4 \times 10^5$  U/L으로 초기 포도당의 농도를 60 g/L으로 하였을 때보다 8배 증가되었다. 높은 포도당의 농도는 OPH 생산을 상당히 저해되었지만, cellular 증식에는 전혀 영향을 미치지 않았다(Figure 15~18). 이는 높은 포도당이 형질전환 성장인자 (TGF, transforming growth factor)의 생산을 증가시키며, 재조합 미생물에 의한 효소의 생산을 감소시킨다고 보고와<sup>86,87</sup> 일치한다.

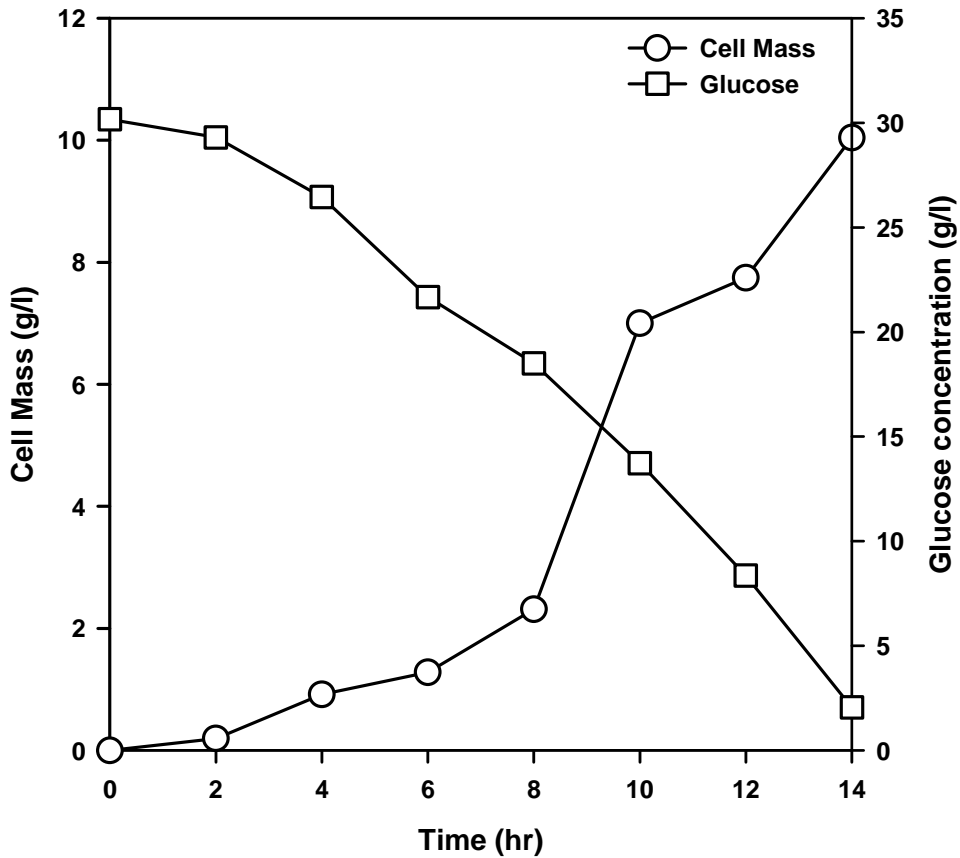
### 3.4 유가식 발효

유가식 배양 반응기는 산업의 응용에서 널리 사용된다. 왜냐하면 유가식 배양 반응기는 회분식 반응기와 연속 반응기의 장점을 결합했기 때문이다. 유가식 발효 공정은 회분식 발효 공정으로 처음에 시작하여 초기 포도당의 농도가 소비되었을 때, 기질을 공급함으로써 정상 상태에 도달하는 것으로 나타난다.

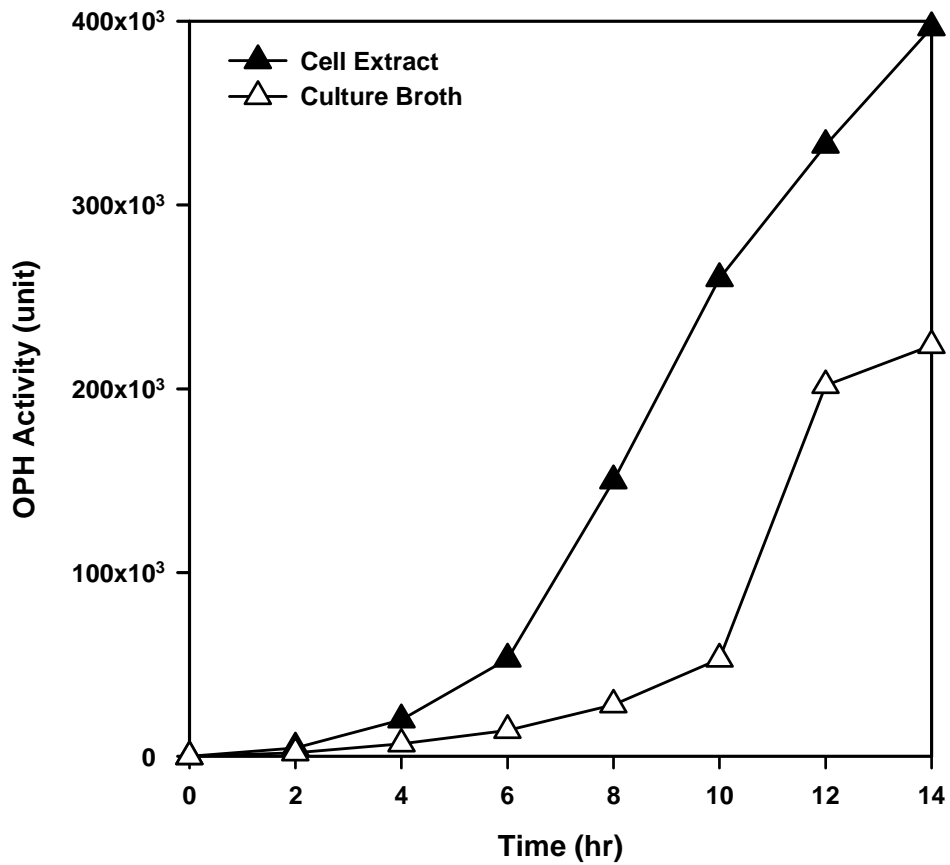
본 연구에서는 OPH 생산을 최적화하기 위해 간단한 유가식 배양 공정을 사용하였다. 회분식 발효 공정에서 포도당의 농도가 고갈되었을 때, 미량 원소와  $\text{CoCl}_2$ 를 포함한 포도당 용액을 간헐적 또는 연속적으로 발효기에 주입시켰다. 발효 24시간 후에 40 g/L의 건체량을 얻을 수 있었다.

먼저, 유가식 배양 공정 중 연속적 (intermittently)으로 농축 배지 (포도당의 농도 500 g/L)를 공급하였다. 효소 농도는 회분식 발효 공정 ( $4 \times 10^5$  U/L)보다  $8 \times 10^5$  U/L으로 증가되었으며, extra cellular OPH는 발효가 진행됨에 따라 서서히 감소하였다. 또한, intra cellular OPH는  $1.5 \times 10^6$  U/L까지 증가되었다(Figure 19 and Figure 20).

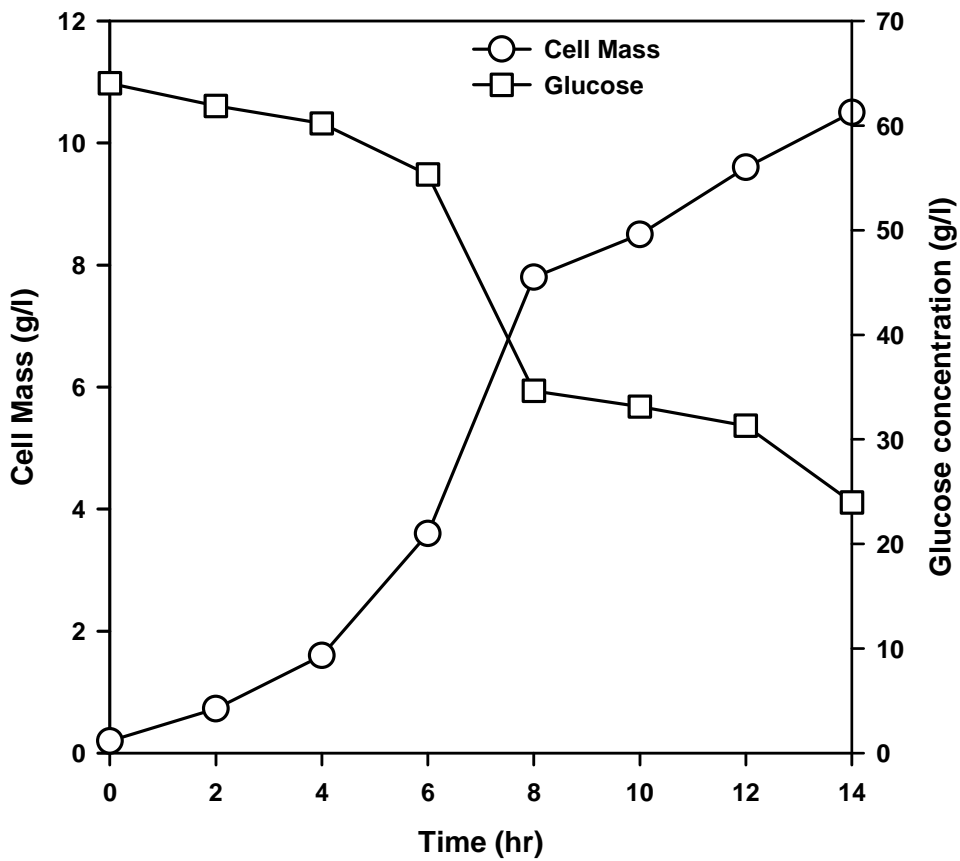
두 번째는 유가식 배양 공정 중 간헐적 (continuously)으로 농축 배지 (포도당의 농도 500 g/L) 400mℓ를 공급하였다. 농축 배지를 공급한 후 포도당의 농도는 아주 빠르게 60 g/L까지 증가하며, 발효가 진행되는 동안 세포가 성장함에 따라 감소하였다. 비록 높은 초기 포도당의 농도가 회분식 배양보다 OPH 생산을 크게 저해함에도 불구하고, 세포의 성장 및 OPH를 생산하는 동안 높은 포도당의 농도는 세포 성장이나 OPH 생산하는데 저해를 끼치지 않았다. 최대 OPH 농도는  $3.2 \times 10^6$  U/L으로 intra cellular OPH는  $1.8 \times 10^6$  U/L이었으며, exetra cellular OPH는  $1.4 \times 10^6$  U/L이었다 (Figure 21 and Figure 22).



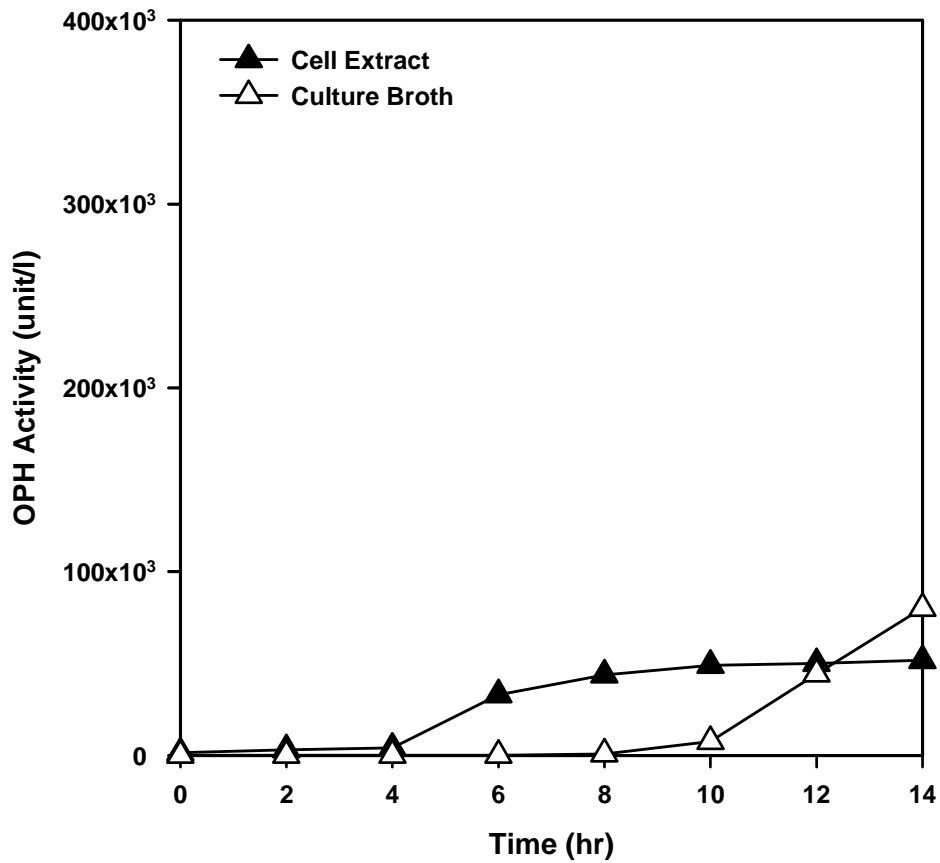
*Figure 15.* The dry cell weight and glucose concentration with 30 g/L initial glucose concentration. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration.



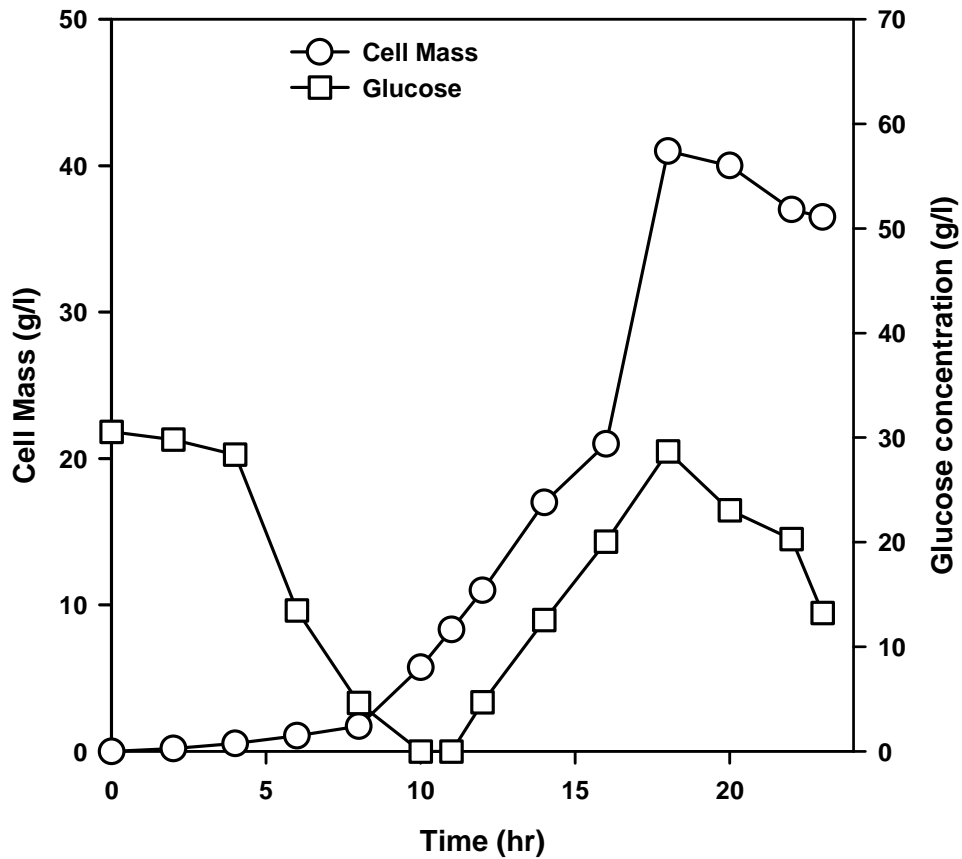
*Figure 16.* The intra and extra cellular OPH concentrations produced with batch fermentation with 30 g/L initial glucose concentration. Symbols: open triangles, extra cellular OPH; closed triangles, intra cellular OPH.



*Figure 17.* The dry cell weight and glucose concentration with 60g/L initial glucose concentration. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration.

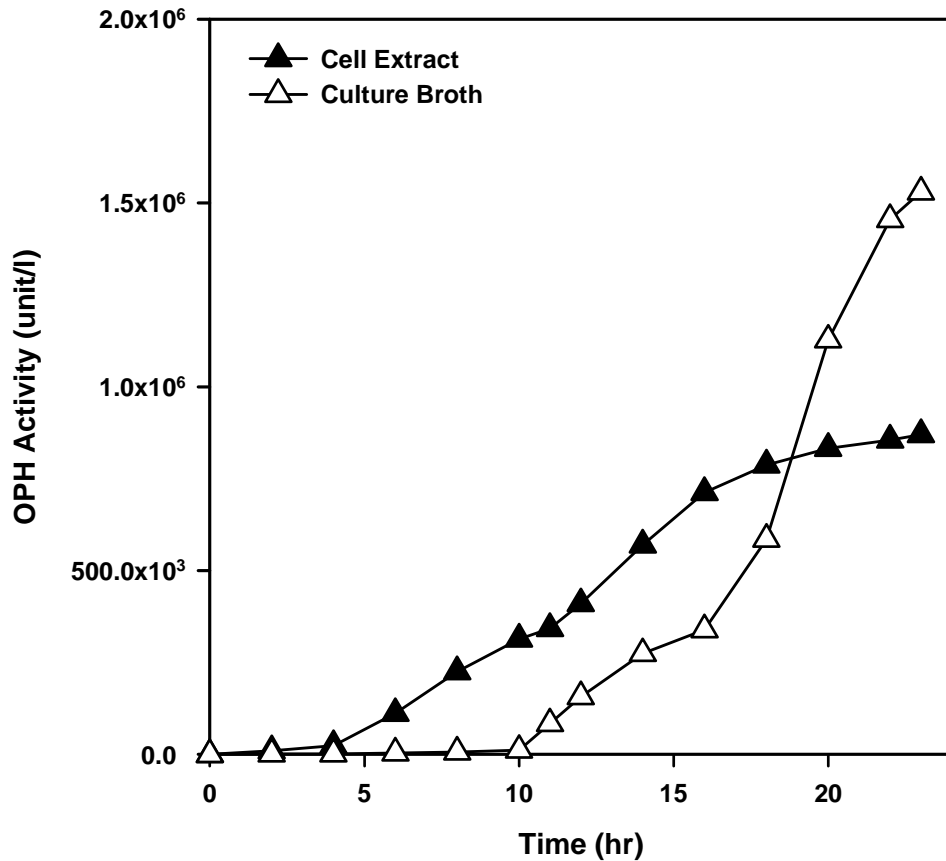


*Figure 18.* The intra and extra cellular OPH concentrations produced with batch fermentation with 60 g/L initial glucose concentration. symbols: open triangles, extra cellular OPH; closed triangles, intra cellular OPH.

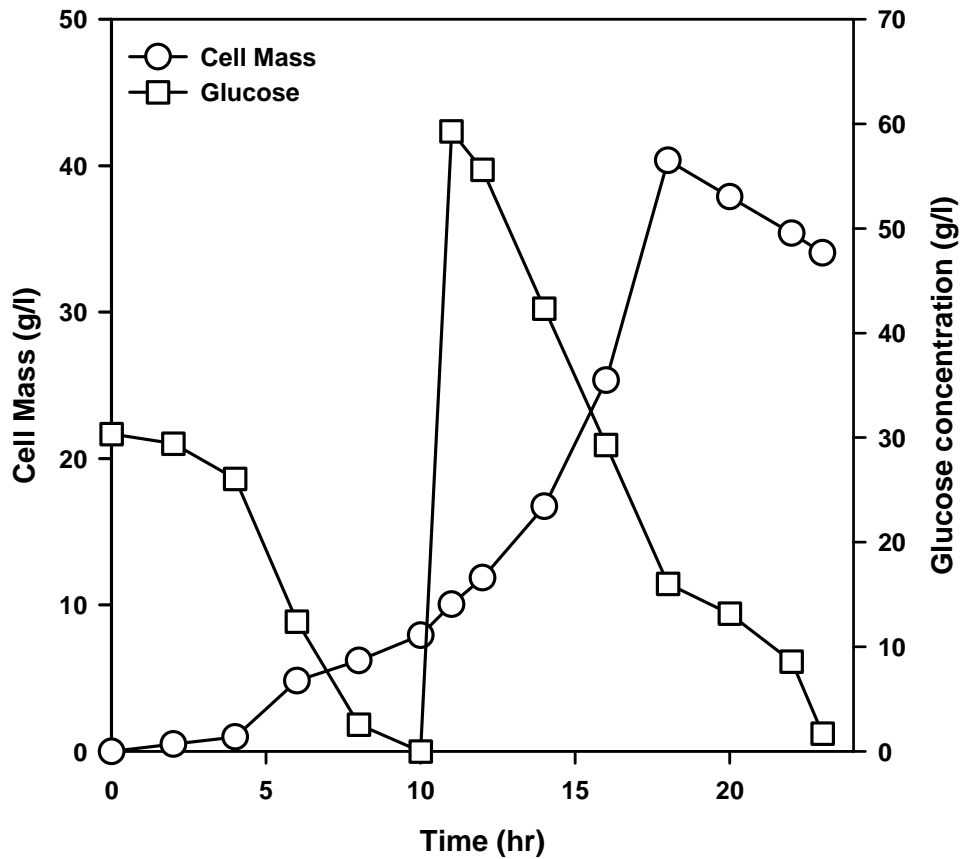


*Figure 19.* The dry cell weight and glucose concentration with fed-batch fermentation. Intermittent feeding method. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration.

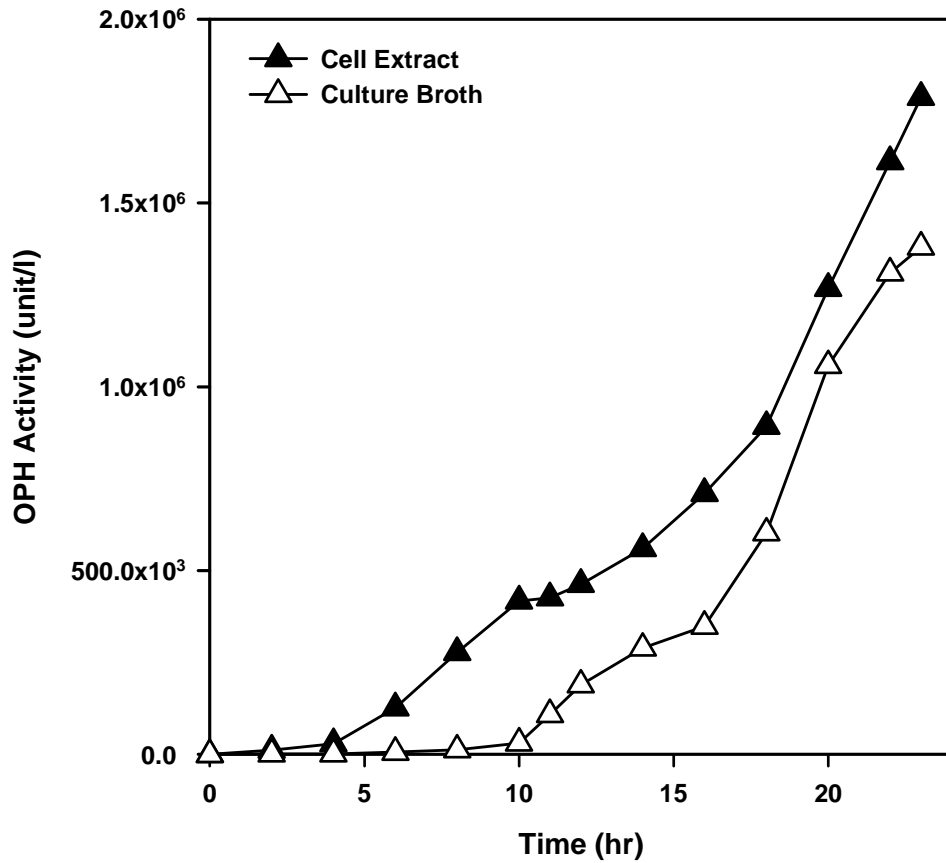




*Figure 20.* The intra and extra cellular OPH concentrations produced with fed-batch fermentation. Intermittent feeding method.  
 symbols: open triangles, extra cellular OPH;  
 closed triangles, intra cellular OPH.



*Figure 21.* The dry cell weight and glucose concentration with fed-batch fermentation. Continuous feeding method. symbols: open circles, total dry cell weight; open squares, glucose concentration.



*Figure 22.* The intra and extra cellular OPH concentrations produced with fed-batch fermentation. Continuous feeding method.  
 symbols: open triangles, extra cellular OPH;  
 closed triangles, intra cellular OPH.

## II-4. 결론

OPH 생산에 있어서 inducer인 IPTG의 영향은 매우 제한적이었다. OPH는 IPTG 없이도 생산되었고 IPTG 첨가에 의해 더 많이 생산되었다. 경제적 관점에서 오히려 IPTG 없이 재조합 OPH를 생산하는 게 효율적이다. 초기 세포 성장단계에서 OPH 생산은 고농도의 포도당에 의해 크게 억제 되었지만, 세포 농도가 10 g/L 되었을 때 세포 성장과 OPH 생산 면에서 저해 현상을 관찰할 수 없었다.

본 연구 결과로부터 간단한 유가식 배양 공정을 개발함으로써 OPH 생산에 적용할 수 있었다. 그람 음성 세균 (gram-negative bacteria)의 미생물이 OPH를 생산한 이후에 생산된 OPH는 세포안에 존재하거나 periplasm (세포벽과 세포막 사이의 공간)안으로 분비된다. 이는 대장균의 표면에 heterologous 효소를 달아 배양액의 세포로부터 효소를 생산할 수 있는 디스플레이 기술을 개발하였다. 세포의 약 44%가 OPH를 분비할 수 있었으며, 24시간 동안의 유가식 발효 공정을 통해 339~441mg/L의 OPH를 생산할 수 있었다.

## V. 참고문헌

- 1) Lee, J. H., H. C. Lim, S. I. Kim, A nonsingular optimization approach to the feed rate profile optimization of fed-batch cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24, 115-121. 2001
- 2) Chaudhuri, U. R., B. R. Chowdhury, R. Chakraborty, Modeling and simulation of diffusional mass transfer of glucose during fermentative production of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H. 16, 237-243. 2003
- 3) Lee, J. H., Lee, I. Y., Kim, M. K., Park, Y. H., Optimal pH control of batch processes for production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 23, 143-1483. 1999
- 4) Lye, G. J., I. Elimahdi, F. Baganz, K. Dixon, T. Harrop, D. Sugden, pH control in microwell fermentations of *S. erythraea* CA340:influence on biomass growth kinetics and erythromycin biosynthesis. *Biochemical Engineering Journal* 16, 299-310. 2003
- 5) Shin, S. Y., B. H. Kim, Effects of pH variation and phosphate limitation on the continuous fermentation of *clostridium acetobutylicum*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 5, 9-18. 1990.
- 6) Moon, H., H. Kim, S. K. Rhee, E. S. Choi, I. H. Kim, S. I. Hong, Optimal strategy of pH control in the production of recombinant human epidermal growth factor by *Hansenula polymorpha*, *Process Biochemistry* 38, 487-495. 2002.
- 7) Lee, J. H., Y. H. Park, Optimal production of curdlan by *Agrobacterium* sp. with feedback inferential control of optimal pH profile. *Biotechnology Letters* 23, 525-530. 2001.

- 8) Lee, J. H., I. Y. H. Park, Feedback control of dissolved oxygen with hardware modification of fermentor. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15, 280–284. 2000.
- 9) Chen, Q., W. E. Bentley, A. Weigand, Optimization for a recombinant E. coli fed-batch fermentation. Appl. Biochem. Biotechnol. 51, 449–461. 1995.
- 10) Lee, J. H., Y. Lee, M. K. Kim, Y. H. Park, Optimal pH control of batch processes for production of curdlan by Agrobacterium species. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 23, 143–148. 1999.
- 11) Lye, G. J., I. Elimahdi, F. Baganz, K. Dixon, T. Harrop, D. Sugden, pH control in microwell fermentations of S. erythraea CA340:influence on biomass growth kinetics and erythromycin biosynthesis. Biochemical Engineering Journal 16, 299–310. 2003
- 12) Shin, S. Y., B. H. Kim, Effects of pH variation and phosphate limitation on the continuous fermentation of clostridium acetobutylicum. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 5, 9–18. 1990
- 13) H. Biebl, K. Menzel, A. P. Zeng, W. D. Deckwer; Microbial production of 1,3-propanediol (1999) 52: 289–297
- 14) Elm R, Falbe J, Hahn HD, Gelbke HP Propaneiole. In: Bartholome E, Biekert E, Hellmann H, Ley H, Weigert M, Weise E(des) Ullmanns Encyklopadie der technischen Chemie, vol. 19. Verlag Chemie, Weinheim. 1980
- 15) Witt, U, R, J. Muller, J. Augusta, H. Widdecke, and W. D. Deckwer, Synthesis, properties and biodegradability of polyester based on 1,3-propanediol, Macromol, Chem. Phys. 195, 793–802. 1994.

- 16) Chang, Ho-Nam. and Jin-Ho, Seo, Biochemical engineering. 2nd ed. p476, academybook Press, Korea. 2001
- 17) Zeng A-P, Biebl H: Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. Adv Biochem Eng. Biotechnol 74:239-259. 2002
- 18) Bories, A., C. Claret, and P. Soucaille, Kinetic study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*, Proc. Biochem. 26, 243-248. 1991.
- 19) Leaver, F. W., H. G. Wood, and R. Sternholm, The fermentation of three carbon substrate by *Clostridium propionicum* and *propionibacterium*, J. Bacteriol. 66, 611-619. 1995
- 20) Gunzel, B., S. Yonsel, and W. D. Decker, Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m<sup>3</sup>, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36. 289-294. 1991
- 21) Gottschalk, G. and B. Averhoff, Process for the microbiological preparation of 1,3-propanediol from glycerol, European patent application 0373 230 Al. 1990.
- 22) Wolf-Dieter Deckwer, Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol, FEMS Microbiology Reviews 16. 143-149. 1995.
- 23) Kim, S. H., S. J. Kim, K. G. Park, S. K. Rhee, C. H. Kim, 1,3-propanediol fermentation using the by-products from fat industry, Korean J. Biotechnol. Bioeng. Vol. 17. No. 3, 255-260. 2002

- 24) Fabien Barbirato, El Hassane Himmi, Thierry Conte, Andre Bories, 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products* 7. 281-289. 1998
- 25) El Hassane Himmi, Andre Bories, Fabien Barbirato, Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology* 67. 123-128. 1999
- 26) Kim. S. H., Kim. S. J., Park. K. G., Rhee. S. K., Kim C. H., 1,3-propanediol fermentation using the by-products from fat Industry. *Biomolecular Process Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB), Yusong Daejeon* 305-333. 2002
- 27) Briggs.G.G., M.Elliott and N.F.james: *Pesticide Chemistry*, Pergamonpress, pp 157-164. 1983.
- 28) Robert Engel: *Handbook of Organophosphorus chemistry*, pp 807-808. 1992
- 29) George W. Ware: *Pesticides*, W,H Freeman and company, pp 145-157. 41-48. 1983.
- 30) Hai Bin Wan, Ming Keong Wong, and Chup Yew Mok: *Comparative Study on the Quantum Yields of Direct Photolysis of Organophosphorus Pesticides in Aqueous Solution*, *J. Agric. Chem.*, 42. pp 2625-2630. 1994.
- 31) Donarski, W. J., D. P. Dumas, D. P. Heitmeyer, V. E. Lewis, F. M. Raushel, *Structure-activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry* 28, 4650-4655. 1989.



- 32) 전순표. 우리나라 쥐 및 위생해충 방제에 대한 문제점과 개선방향, 대한위생학회지. 7. 129-140. 1992.
- 33) 안용준. 방역용 의약외품의 규격연구, 식품의약품안전청 기술보고서. pp 231. 2003
- 34) 농림부. <http://www.maf.go.kr>.
- 35) 농약공업협회. <http://www.koreacpa.org>.
- 36) UNEP. Master list of actions on the reduction and/or elimination of the releases of persistent organic pollutants. United Nations Environmental Programs. 2003
- 37) Bavcon, M., P. Trebse and L. Zupancic-Kralj, Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector, Chemosphere. 50. 595-601. 2003
- 38) 박권일, 김훈섭, 조성일. The crystal and molecular structure of chlorpyrifos, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>C<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>PS, The Institute of Industrial Technology. 6. 133-142. 1998.
- 39) Richard D. Newcomb, Peter M. Campbell, Robyn J. Russell, John G. Oakeshott, cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Luclia cuprina*, Insect Biochem. Molec. Biol., 27:15-25. 1997.
- 40) Gary D. Bending, Maxime Friloux, Allan Walker, Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential, Microbiology letters. 212:59-63. 2002.

- 41) Robertson L.N., K.J. Chandler, B.D.A. Stickley, R.F. Cocco and M. Ahmetagic, Enhanced microbial degradation implicated in rapid loss of chlorpyrifos from the controlled-release formulation suSCCom<sup>(R)</sup> Blue in soil, *Crop protection*. 17:29-33. 1998.
- 42) Heng Jin, G.R. Barrie webster. Persistence, penetration, and surface availability of chlorpyrifor, its oxon, and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in Elm bark, *J. Agric. Food Chem.* 45:4871-4876. 1997.
- 43) Mamoru Kamiya and Katsura Kameyama, Photochemical effects of humic substances on the degradation of organophosphorus pesticides, *Chemosphere.* 36:2337-2344. 1998.
- 44) Qing-yin Wu Li Li, Yi-hang Guo, Ghang-wen Hu, Nanosize and bimodal porous polyozotungstate-anatase TiO<sub>2</sub> composites: Preparation and photocatalytic of organophosphorus pesticide using visible-light excitation. *Microporous and Mesoporous Materials.* 87:1-9. 2005.
- 45) Liu B., L. L. McConnell, A. Torrents, Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay, *Chemosphere*, 44:1315-1323. 2001.
- 46) Harper, L. L., C. S. McDaniel, C. E. Miler, and J. R. Wild. Dissimilar plasmid isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and *Flavobacterium* sp.(ATCC 27551) contain identical opd genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:246-249. 1988.
- 47) McDaniel, C. S., and J. R. Wild. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by southern hybridization with opd from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:926-930. 1986.

- 48) McDaniel, C. S., Harper, L. L., and J. R. Wild. Cloning and sequencing of a plasmid-borne gene(*opd*) encoding a phospho-triesterase. *J. Bacteriol.* 170:2306-2311. 1989.
- 49) Mulbry, W., and J. S. Karns. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene; relationship between the gene and protein. *J. Bacteriol.* 171:6740-6746. 1989.
- 50) Segar, C. M., Gibson, D. T. Munnecke, D. M. and J. H. Lancater. Plasmid involvement in parathio hydrolysis by *Pseudomonas Diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:246-249. 1982.
- 51) DeFrank, J. J., and T. C. Cheng. Purification and properties of and organophosphorus acid anhydrolase from a halophilic bacterial isolate. *J. Bacteriol.* 173. 1938-1943.
- 52) DeFrank, J. J., W. T. beudry, T. C. Cheng, S. P. Harvey, A. N. Stroup, and I. Szafranicel. Screening of halopholic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chem, Biol. Interact.* 87. 141-148. 1993.
- 53) Attaway, H., J. O. Nilson, A. M. Baya, M. J. Voll, W. E. White, D. J. Grimes, and R. R. Colwell. Bacterial detoxification of diisopropyl fluorophosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 53. 1685-1689. 1987.
- 54) Dumas, D. P., H. D. Drust, W. G. Landis, F. M. Raushel, and J. R. Wild. Inactivation of orgarmophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Arch. Biochem. Biophys.* 277. 155-159. 1990.

55) Cheng, T. C., S. P. Harvey, and A. N. Stroup. Purification and properties of a highly active organophosphorus acid anhydrase from *Alteromonas undina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59. 3138-3150. 1993.

56) Liu, L., Wu, J., Wang, B., and D. M. Anderson. purification and characterization of an organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas haloplanktis* C and *Alteromonas* sp. M. P. 12, In international workshop on biocatalytic degradation of chemical warfare related materials. U. S. Army, ERDEC, Aberdeen Proving Ground, MD. 1995.

57) Cheng, T. C., S. P. Harvey, and G. Chen. Cloning and expression of g gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 62. 1636-1641. 1996.

58) Cheng, T. C., and J. J. Calomiris. A cloned bacterial enzyme for nerve agent decontamination. *Enzyme and Microbiol. Tech.* 18. 597-601. 1996.

59) Mulbry, W.W., J.F.Hams Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *flavobacterium* sp. by Southern hybridization with opd from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51. 926-930. 1989

60) Dumas, D. P., H. D. Durst, W. G. Landis, F. M. Raushel, J. R. Wild, Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Arch Biochem. Biophys.* 227. 155-159. 1990.

61) Viveros, L., et al., *A fluorescence-based biosensor for the detection of organophosphate pesticides and chemical warfare agents*. *Sensors and Actuators B*, 2006(in press).

- 62) Deo, R.P., et al., *Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor*. Analytica Chimica Acta, 2005. 530(2): p. 185.
- 63) Casida, J.E. and G.B. Quistad, *Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants*. Chemico-Biological Interactions, 2005. 157-158: p. 277.
- 64) Serdar, C.M. and D.T. Gibson, *Enzymatic Hydrolysis of Organophosphates: Cloning and Expression of a Parathion Hydrolase Gene from Pseudomonas diminuta*. Nat Biotech, 1985. 3(6): p. 567.
- 65) Ang, E.L., H. Zhao, and J.P. Obbard, *Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering*. Enzyme and Microbial Technology, 2005. 37(5): p. 487.
- 66) Russell, A.J., et al., *Biomaterials for Mediation of Chemical and Biological Warfare Agents*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2003.
- 67) Mansee, A.H., W. Chen, and A. Mulchandani, *Detoxification of the organophosphate nerve agent coumaphos using organophosphorus hydrolase immobilized on cellulose materials*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005. 32(11-12): p. 554-60.
- 68) Mouches, C., et al., *Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant Culex mosquitoes and their presence in other insects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(8): p. 2113-6.
- 69) Serdar, C.M. and D.C. Murdock, *Parathion hydrolase analogs and methods for production and purification*, in *Patent and Trademark Office*. 1996, Amgen Inc.

70) Srinivasan, S., G.C. Barnard, and T.U. Gerngross, *A Novel High-Cell-Density Protein Expression System Based on Ralstonia eutropha*. Appl Environ Microbiol, 2002. 68(12): p. 5925-5932.

71) Srinivasan, S., G.C. Barnard, and T.U. Gerngross, *Production of Recombinant Proteins Using Multiple-Copy Gene Integration in High-Cell-Density Fermentations of Ralstonia eutropha*. Biotechnol Bioeng, 2003. 84(1): p. 114-120.

72) Barnard, G.C., et al., *High level recombinant protein expression in Ralstonia eutropha using T7 RNA polymerase based amplification*. Protein Expression and Purification, 2004. 38(2): p. 264.

73) Mulchandani, A., I. Kaneva, and W. Chen, *Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized Escherichia coli with surface-expressed organophosphorus hydrolase*. Biotechnol Bioeng, 1999. 63(2): p. 216-23.

74) Cheng, T.-C., S.P. Harvey, and G.L. Chen, *Cloning and Expression of a Gene Encoding a Bacterial Enzyme for Decontamination of Organophosphorus Nerve Agents and Nucleotide Sequence of the Enzyme*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1996. 62(5).

75) Pinkerton, T.S., *The Recombinant Expression and Potential Applications of Bacterial Organophosphate Hydrolase in Zea mays L.*, in *Biochemistry*. 2004, Texas A&M University: Texas. p. 127.

76) Grimsley, J.K., et al., *Organophosphorus Hydrolase Is a Remarkably Stable Enzyme That Unfolds through a Homodimeric Intermediate<sup>†</sup>*. Biochemistry, 1997. 36: p. 14366-14374.

- 77) McLoughlin, S.Y., et al., *Growth of Escherichia coli coexpressing phosphotriesterase and glycerophosphodiester phosphodiesterase, using paraoxon as the sole phosphorus source*. Appl Environ Microbiol, 2004. 70(1): p. 404-12.
- 78) Kang, D.G., J.Y.H. Kim, and H.J. Cha, *Enhanced detoxification of organophosphates using recombinant Escherichia coli with co-expression of organophosphorus hydrolase and bacterial hemoglobin*. Biotechnology Letters, 2002. 24: p. 879-883.
- 79) Kang, D.G., G.-B. Lim, and H.J. Cha, *Functional periplasmic secretion of organophosphorous hydrolase using the twin-arginine translocation pathway in Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 2005. 118: p. 379-385.
- 80) Omburo, G.A., et al., *Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase*. The Journal Of Biological Chemistry, 1992. 267(19): p. 13278.
- 81) Zhang, X.-Z., et al., *High-Level Expression and Secretion of Methyl Parathion Hydrolase in Bacillus subtilis WB800*. Appl Environ Microbiol., 2005. 71(7): p. 4101-4103.
- 82) Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31. 426-428. 1959
- 83) Reinhold, D., S. Ansorge, and E.D. Schleicher, *Elevated glucose levels stimulate transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), suppress interleukin IL-2, IL-6 and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells*. Horm Metab Res, 1996. 28(6): p. 267-70.