

생명공학 기술을 이용한 사료 첨가용 biotin  
생산균주 및 상업화 기술개발

Commercialization and strain development  
for the production of biotin

연구기관 : (주) 콧 데

농림수산식품자료실



0017058

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생명공학 기술을 이용한 사료 첨가용 biotin 생산균주 및 상업화 기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : (주)코테

총괄연구책임자 : 김 창 호

세부연구책임자 : 김 창 호

연 구 원 : 하 병 집

연 구 원 : 유 명 규

연 구 원 : 권 영 기

위탁연구기관명:한국외국어

대학교

위탁연구책임자 : 이 현 환

# 요 약 문

## I. 제 목

생명공학 기술을 이용한 사료 첨가용 biotin 생산균주 및 상업화 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 필수 비타민 중의 하나인 biotin (Vitamin H)을 기존의 화학합성법을 대체하여 생물학적 공정으로 생산하는 것이다. 기존의 화학적 합성방법은 시발물질의 가격이 높은 문제로 인한 다단계의 반응공정이 필요, 환경유해물질인 유기물질의 사용, 조업조건의 복잡함에서 오는 높은 공정 비용의 이유에서 생산단가가 높고 환경친화적인 공정을 구축하기가 힘들게 된다. 본 연구에서는 유전공학 기법 및 돌연변이 방법을 이용하여 비오틴을 높은 농도로 생산하는 미생물을 개발하고 발효 및 정제공정을 확립하여 생물학적인 방법을 비오틴을 생산하는 상업화 기술을 개발하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

전통적인 돌연변이 방법과 유전공학 기법을 이용하여 비오틴 생산성이 높은 고역가 균주를 개발한다. 개발된 균주를 활용하여 배지 및 배양공정의 최적화를 통하여 발효공정을 개발한다. 일차적으로 사료첨가제로 사용할 수 있는 비오틴 생산정제공정을 확립하여 시제품 생산 및 마케팅을 위한 자료를 제공한다. 향후 정제공정을 더욱 개선하여 의약품 및 식품첨가제로 사용할 수 있는 고순도 비오틴 생산을 위한 기반을 마련한다. Pilot 실험을 통하여 향후 상업화를 위한 scale-up 데이터를 확보한다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

돌연변이 및 유전공학 기법을 활용하여 4g/L 이상의 비오틴 생산성을 지닌 균주의 개발과 이를 활용한 발효 및 정제공정을 개발하여 상업화를 위한 준비를 완료 함. 사료첨가제로 판매를 진행하기 위하여 좀더 품질이 향상된 제품을 활용하여 기존의 합성제품과 비교 시험 성적 및 안정성 데이터를 확보가 필요하다고 판단 됨.

## SUMMARY

Biotin, also known as vitamin H or B7, has the chemical formula  $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ . Biotin is used in cell growth, the production of fatty acids and in the metabolism of fats and amino acids. Biotin is important in the catalysis of essential metabolic reactions to synthesize fatty acids, in gluconeogenesis, and in metabolizing leucine. It plays a role in the Citric acid cycle, which is the process by which biochemical energy is generated during aerobic respiration. Biotin not only assists in various metabolic chemical conversions, but also helps to transfer carbon dioxide. Biotin is also helpful in maintaining a steady blood sugar level. It also promotes healthy sweat glands, nerve tissue, and bone marrow. In addition it also helps to relieve muscle pain. Biotin deficiency can result in hair loss, depression, anaemia, insomnia, loss of appetite, muscular pain, nausea, soreness of the tongue, inflammation or pallor of the skin and mucous membranes, and an elevation of blood glucose and cholesterol levels. Biotin deficiency is frequently associated with epileptic seizures and studies suggest that it facilitates convulsive disorders (Bregola).

Biotin is mainly used in medicine and health, nutritional supplements, feed additives, food additives, cosmetics and health products, and beverages and so on. Especially for feed additives, most of the current global production of Vitamin H is for this purpose. Biotin is often recommended for strengthening hair and nails. Consequently, it is found in many cosmetic and health products for the hair and skin.

Biotin is produced through several steps of chemical synthesis. The chemical synthesis process of biotin are using many kinds of toxic chemicals and producing lots of toxic by-products. These by-products may cause environmental problem. Therefore many scientists have tried to develop microorganisms to produce biotin with high level. But there are no results or reports to succeed in development of strains producing biotin with high potency. We have tried to develop biotin producing microorganisms using genetic engineering methods and conventional strains development methods. We succeed in development of biotin producing microorganisms with high potency and commercial scale of producing technologies including fermentation and purification.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction	
1. Production of biotin using microorganisms .....	8
2. Market of biotin .....	10
3. Purpose of development .....	2
4. The future market of biotin .....	3
Chapter 2. Situation of development for the production of biotin	
1. Fermentation industry in South Korea .....	11
2. Development of biotin production with microorganisms in South Korea .....	11
3. Development of biotin production with microorganisms in world .....	15
Chapter 3. Results of research	
1. Strains development .....	16
1) Medium and culture conditions .....	16
2) Strain development with conventional methods .....	8
3) Strain development with genetic engineering .....	8
2. Medium and process optimization for fermentation .....	5
3. Process development of purification .....	6
4. Commercial scale fermentation with 20 KL fermenter .....	17
Chapter 4. Object and achievement	
1. Object and achievement according time schedule .....	7
2. Object and achievement according research teams .....	8
Chapter 5. Future plan for business	
1. Business plan for biotin as raw material .....	8
2. Business plan for biotin as finished product .....	8
1) Business plan for biotin as feed additive .....	8

Chapter 6. Informations about biotin research and business

Chapter 7. Reference .....84

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
1.	미생물을 이용한 비오틴 생산 기술 목적 및 필요성	8
2.	비오틴 시장 현황	10
3.	연구개발의 필요성	12
4.	비오틴 산업의 향후 전망	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황	
1.	국내 발효산업 현황	14
2.	미생물을 이용한 국내 비오틴 기술 개발 현황	14
3.	미생물을 이용한 해외 비오틴 기술 개발 현황	15
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	
1.	균주개발	16
1)	사용배지 및 배양 조건	16
2).	돌연변이기술을 이용한 비오틴 균주개발	8
3).	유전공학기술을 이용한 비오틴 균주개발	8
2.	배지 및 발효공정 최적화 실험	54
3.	정제공정 개발	69
4.	20 KL 상업화 발효조 실험	74
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
1.	연차별 연구개발 목표와 달성도	75
2.	기관별 연구 목표 달성도 및 기여도	80
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	
1.	원료 사업화 방안	81
2.	완제 사업화 방안	82
1).	사료첨가제 사업화 방안	82

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7장 참고문헌 ..... 84



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 미생물을 이용한 비오틴 생산 기술 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 필수 비타민 중의 하나인 biotin (Vitamin H)을 기존의 화학합성법을 대체하여 생물학적 공정으로 생산하는 것이다. 비타민 B의 복합체의 하나인 biotin은 많은 microorganism과 animal 그리고 plant의 필수적인 nutritial supplement이다. 이에 대한 연구는 1935년 처음 Kogl에 의해 biotin이라고 명명되면서 시작되었으며, 1940년 Gyotgy에 의해 vitamin H와 동일 물질이라는 것이 밝혀졌다. biotin은 세포내의 포도당이 대사 되는 과정에서, Pyruvic acid는 Carboxylase의 작용으로 Oxalacetic Acid(OAA) 되고 OAA는 간장 등의 조직에 이송되어 다시 포도당으로 전환될 때 carboxylase 작용을 도와주는 cofactor로서 당 신생에 중요한 역할을 하며 지방산이나 아미노산의 대사 와 DNA성분이 되는 핵산을 만들 때에도 biotin을 함유하는 효소가 작용하여 세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다(그림1).

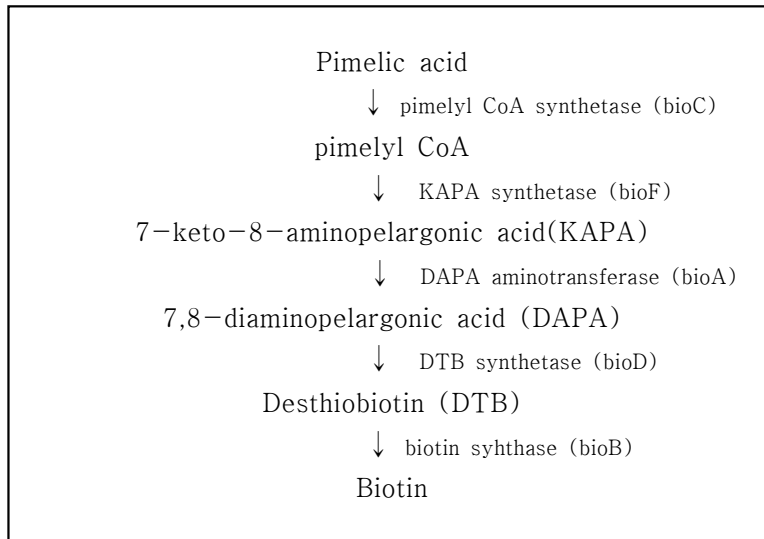


그림1. biotin의 생합성과정

Biotin은 사람과 동물 모두에게 필요한 필수 비타민이며, 부족할 경우 사람에게선 피부염, 구토, 식욕부진, 권태, 근육마비, 고콜레스테롤혈증, 여러 가지 선천성 질환 등의 증상을 나타내며, 가금류, 돼지, 소 등의 동물에서는 지방간, 지방 신장, 피부질환, 발굽 무름 등의 질환과 성장률 감소, 지방의 포화도 증가, 산유량 감소 등의 심각한 현상들로 인해 농가 소득이 감소되기 때문에 반드시 외부로부터 섭취되어야 한다. 미

국의 경우, 성인에 있어서 biotin의 1일 섭취량을 100-200  $\mu\text{g}$ 으로 규정하고 있다.

미생물에서 biotin은 pimelic acid를 전구물질로 하여 pimelyl-CoA, 7-keto-8 amino pelargonic acid(KAPA), 7,8-diaminopelargonic acid(DAPA), desthiobiotin (DTB)를 intermediate로 하여 생합성을 하며, 대부분의 박테리아 및 곰팡이류는 스스로 생합성할 수 있으나 가축 및 사람은 스스로 합성할 수 없는 vitamin으로 가축의 성장을 촉진하기 위한 사료 첨가제, 혹은 식품첨가제, 주사제 및 향생물질과 다른 의약품의 합성 및 생산의 원료로 이용되는 등 그 유용성이 매우 큰 물질이다 (그림 2).

현재 시판되고 있는 모든 biotin은 화학합성법에 의해 생산되고 있다. Biotin의 다양한 전구체가 알려져 있고 이로부터 화학적 합성방법을 통해 합성되지만 그 전구체의 가격이 비싸다는 문제로 인하여, 이를 또한 다른 전구체로부터 합성하는 공정을 반드시 거쳐야만 한다. 그 결과 10 스텝 이상의 복잡한 합성 공정단계에 걸쳐서 biotin을 생산하고 있는 실정이다. 또한 각 반응마다 환경 및 인체에 유독한 다량의 합성원료를 사용하는 것으로 알려져 있으며, 동시에 80°C 이상의 고온 또는 -40°C 이하의 저온을 요구하는 경우가 많아서 생산 비용이 높을 수밖에 없다. 이로 인하여 서양의 대부분 biotin 생산업체 역시 생산시설을 중국 또는 인도와 같은 저개발국가로 이전하는 추세이다. 한편 이와 같은 극단적 온도조건에서 생성된 반응물은 불순물이 많이 생성되므로 순도가 떨어지게 되고 다음 반응에 이용될 생성물을 분리하는데도 복잡한 공정이 수반되게 된다. 각 반응단계에서의 분리공정은 대부분 추출법에 의존하므로 다양한 유기 용매가 다량으로 요구된다. 이러한 유기 용매는 재사용되거나 폐기되어야 하는데, 유기 용매를 재사용하기 위해서는 분리공정이 추가적으로 필요하기 때문에 공정단계 측면에 있어서 폐기되는 경우가 대부분이다. 그러므로 심한 환경적 문제를 유발할 수 있고, 이를 정화하기 위한 추가적 시설비용이 발생하게 된다. Biotin은 광학이성질체로 존재하게 되는데 생체에 투입되기 위해서는 그 중 D-biotin 만이 정제되어야 한다. 실제 화학반응으로 인하여 생기는 생성물은 D form과 L form이 50:50으로 생성되는 racemic mixture의 형태로 생성된다. 이는 물리, 화학적 성질이 유사하기 때문에 이를 물리, 화학적인 방법으로 분리, 정제하는 데는 상당한 분리공정 비용이 수반되게 된다. 실제 biotin의 화학적 합성공정에 있어서도 공정에 따라 차이가 있지만 중간체 또는 biotin이 racemic mixture의 형태로 생성되게 되어 이를 따로 분리하는 공정이 생산원가의 큰 비중을 차지하게 된다. 기존의 화학적 합성방법은 시발물질의 가격이 높은 문제로 인한 다단계의 반응공정이 필요, 환경유해물질인 유기물질의 사용, 조업조건이 복잡함에서 오는 높은 공정비용의 이유에서 생산단가가 높고 환경 친화적인 공정을 구축하기가 힘들게 된다. 그래서 본 연구에서는 생물학적인 방법을 이용하여 이러한 문제점들을 해결하려고 한다. 전술한 바와 같이 biotin은 대부분의 생물, 특히 미생물에 있어서 TCA cycle을 구성하는 필수 물질인 다양한 carboxylase의 co-factor로써 생성된다. 화학적 반응에 의해서는 상당히 복잡한 공정

으로 합성되지만 생체 내에서는 상온에서 매우 쉽게 생성될 뿐만 아니라 D-biotin만을 선택적으로 생성한다. 실제로 biotin을 생산하여 세포 밖으로 배출하는 여러 미생물이 알려져 있고 이러한 미생물을 이용한다면 복잡한 공정을 거치지 않고도 biotin을 생산해 낼 수가 있다. 따라서 본 연구에서는 균주 분리와 돌연변이, metabolic engineering된 균주, 더 나아가 biotin operon을 vector에 삽입시킨 숙주 미생물을 형질전환 시키는 유전자 재조합 기술을 도입하여, *Serratia marcescense*, *E.coli*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium flavum* 등을 이용하여 biotin의 생산을 시도하고자 하였다.

## 2. 비오틴 시장 현황

그림2에서 보는 바와 같이 biotin은 사료용과 식품/의약용으로 많이 사용되고 있는데 연간 수요가 계속 증가하고 있어 시장성이 매우 높다. 또한 1996년에 Lonza사의 합성법에 의한 대량 생산으로 1997년에 하락했던 가격이 Lonza사가 생산 중단을 함에 따라 biotin의 가격이 계속 오르고 있는 추세이다.

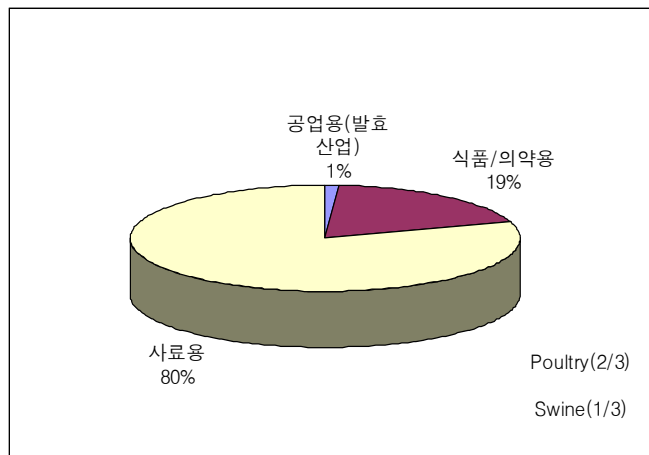


그림 2. biotin의 용도별 시장현황

현재 biotin의 주 용도는 사료, 식품, 의약품, 공업용 발효 기질, 화장품 원료 등으로 사용되고 있고, 그중 사료첨가용이 시장의 80%로 점유율이 가장 높다(그림2, 표1). Biotin 제품은 100% 순수 정제된 제품과 biotin을 2% 첨가한 식품 또는 사료첨가용 제품이 유통되고 있다. 1998년 이후 세계시장에서의 biotin의 가격과 수요는 표 1, 2와 같이 1990년 이후에는 꾸준히 증가하고 있다. 이는 Lonza 사가 biotin 합성법에 의한

사업을 포기한 것에 원인이 있다고 할 수 있다 (그림 3). 지역별로 biotin의 수요는 유럽, 미국, 아시아 순으로 시장이 형성되어 있고, 향후 이러한 증가 추세는 계속될 것으로 전망된다(표3).

표 1. 용도별 시장 현황

용도	점유율(%)
사료용	80
식품/의약품용	19
발효배지용	1

표 2. 과거 판매 추이

	1998	1999	2000	2001	2002.1
100%(U\$/Kg)	1,400	1,350	1,800	2,200	3,500
2%(U\$/Kg)	27	25	40	42	60

표 3. 년도별 과거 수요현황 및 향후 전망 (단위 : 톤)

지역	1999	2001	2002	2003	2004	2005	2007	2008
유럽	21	23	24	25	30	40	60	70
미국	21	21	22	22	28	35	45	50
중국	3	3	4	5	7	9	10	10
아시아	5	5	5	5	7	9	10	10
계	50	52	55	57	72	93	125	140

Biotin의 주요 생산업체는 표 4와 같다. 이중 Roche사(현 DSM)가 생산량에서 가장 앞서있고, 국내 유일한 biotin 생산 업체인 이성화학은 합성원료 수급 및 합성공장 운영의 어려움과 노사 문제 등이 종합 원인이 되어 수익성이 좋음에도 불구하고 2003년 생산을 포기하여 현재 생산 업체는 없는 상황이다.

표 4. 주요 생산사 공급능력 현황\*

\*(100% biotin 기준)

업체	위치	생산능력(톤/년)
Roche	독일	40
Sumitomo	일본	10
Shengda	중국	10
HNU	중국	5

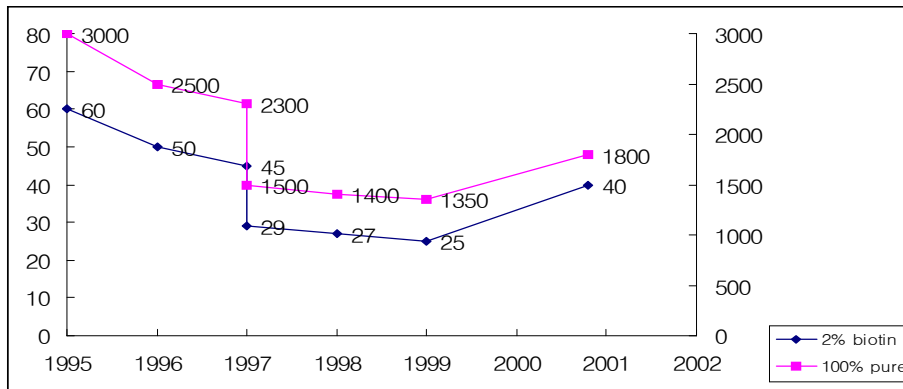


그림3. biotin의 2002년까지의 가격동향 (\$/Kg)

### 3. 연구개발의 필요성

본 연구에서는 고전적 돌연변이법 및 대사 공학적 방법을 통하여 biotin을 과량 생산하는 고생산 균주를 개발하고, 또한 biotin 생합성에 관한 유전자 수준의 연구, genomics, proteomix등의 연구 결과를 바탕으로 재조합 biotin 고 생산 균주의 생물학적 발효 공정을 개발함으로써 biotin을 고수율, 고생산성으로 생산할 수 있는 토대를 마련하고자 하는 것이다. 생물학적 기술을 이용하여 D-biotin을 상온에서 단일 반응으로 생산할 경우 합성공정과 비교할 때 친환경적임은 물론이고 경제적으로 큰 경쟁력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다. 반응에 필요한 원료물질은 균주 배양에 필요한 배지 성분이 전부이므로 합성공정과 비교하여 원료 수급문제가 원천적으로 해결될 뿐만 아니라, 반응조건이 간단하고 공정이 단순해지므로 공정비용을 절감할 수 있다. 반응이 끝난 후 폐기 되는 미생물 및 발효 부산물은 기본적으로 환경 친화적 물질이기 때문에 환경오염의 가능성이 없고, 균체를 재사용할 수 있는 연속공정을 개발함으로써 공정비용과 폐기물을 절감할 수 있다. 결과적으로 biotin 생산단가를 크게 낮춤으로써 가격 경쟁력을 확보할 수 있고, 환경 친화적인 공정을 구축할 수 있게 된다.

현재 biotin을 생물학적 방법을 이용하여 생산하는데 있어서 가장 큰 문제점은 생산성이 높은 미생물을 개발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구진은 그동안 bio법을 이용한 의약품 생산을 위한 전통적 돌연변이를 이용한 균주 개발, 대사공학, 유전자 조작 등의 방법을 이용한 고역가 미생물의 개발, 개발된 미생물을 이용한 발효 및 공정 최적화 작업 및 이를 통한 생물공정 개발 연구를 주로 수행해 왔고, 그 성과들은 직접 상업화로 연결되어 국내외 판매를 하였으며 국내외 저널에 다수 보고 해 왔다. Biotin 생산에 있어서도 이러한 연구 성과를 활용한다면 상업성을 갖추고 동시에 환경 친화적 공정인 생물학적 공정을 이용하여 비오틴의 생산이 가능할 것으로 판단된다.

#### 4. 비오틴 산업의 향후 전망

현재 biotin 시장은 중국에서 생산되는 저가의 제품으로 인하여 가격이 많이 하락된 상태이다. 하지만 대부분 중국의 biotin 생산회사 역시 저가 출시로 인한 많은 손실을 보고 있다고 알려져 있다. 동시에 중국 위엔화는 지속적으로 절상 압력을 받고 있으며, 위엔화 절상시 중국 상 저가의 biotin 생산은 더 이상 어려워져 정상적인 biotin 시장이 형성될 것으로 기대된다. 동시에 중국 역시 환경문제의 중요성이 크게 대두되고 있기에 더 이상 현재와 같은 저가로 biotin을 생산하기는 어려울 것으로 판단된다. Biotin의 시장성과 국내의 미비한 연구에 미루어 볼 때 본 연구가 성공적으로 수행된다면 수입대체 효과는 물론 국가 경쟁력에도 크게 이바지 할 수 있을 것이라 판단된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내 발효산업 현황

국내의 바이오사업은 60년대 대상(미원) 및 제일제당이 아미노산을 발효 방법으로 생산하느로서 본격적으로 시작되었다. 80년대 유한, 종근당, 제일제당등 제약회사 들이 항생제 발효 사업을 시작하였고, 이것은 국내 기업들의 제약 관련 바이오산업의 효시가 되었다. 이후 국내 발효 산업은 양과 질적으로 성장을 거듭한 결과, 2001년 현재 아미노산(MSG, 라이신), 핵산, 항생제 (7-ACA) 분야에서 세계 1위의 발효 산업 국가로 성장하였다. 1950년대 미국및 영국에서 시작된 발효 산업은 70-80년 일본에서 비약적 발전을 하였지만 90년 이후 많은국내 연구진 및 기술자들에 의하여 한국이 발효 최강국으로 성장하였다. 국내 제약및 생물공학 관련 기업들은 발효 산업을 통하여 풍부한 생물공학 관련 우수 인력을 양성할 수 있었으며, 발효 설비 그리고 생물산업 상업화에 관한 Know-how, 기존 제조업과 많은 차이가 있는 제약 마케팅에 관한 네트워크를 구축하게 되었다. 발효로부터 시작된 생물학적 의약품에 대한 기업들의 경험과 여기서 배출된 인력들은 이후 녹십자, 제일제당, 엘지등 국내 제약기업으로 하여금 백신, EPO, 인터페론등 단백질 의약품 사업을 본격적으로 수행할 수 있는 밑거름이 되었다. 하지만 2000년 이후 중국, 인도에서 저가 발효제품에 대한 대량생산이 시작되면서 매우 어려운 상황에 처하게 되었다. 2007년 현재 발효기술을 이용하여 생산되는 라이신, MSG와 같은 저가의 아미노산 산업은 모두 해외로 생산기지가 이전된 상태이며, CPC와 같은 부가가치가 낮은 항생제 산업역시 모두 중단된 상태이다. 현재 국내 발효산업은 많은 전문인력과 우수한 설비가 있음에도 불구하고 적절한 생산품목이 없어 가동이 중단된 매우 어려운 상황이 있다. 하여 국내의 산업 여건을 고려할 때 KG당 1,000달러 이상의 고부가 가치제품의 생산 기술개발 및 상업화가 절실한 시기이다.

### 2. 미생물을 이용한 국내 바이오 기술 개발 현황

국내에서는 미생물을 이용한 바이오 기술개발에 관한 연구보고는 알려져 있지 않다. 합성으로 바이오틴을 생산하던 이성화학이 공장 운영을 중단한 이후 기술인력과 설비를 구입하여 바이오틴을 합성으로 생산하고자 하는 움직임은 있었으나 생산원가 및 환경문제를 해결하는 것이 어려워 중단되었다. 국내는 19080년부터 2000년도 까지 아미노산, 핵산 및 항생물질 생산을 통하여 많은 발효인력과 설비를 가지고 있다. 지금 까지 균주개발기술 및 유전자 공학기법을 활용하여 바이오틴을 생산하는 우수한 균주를 개발한다면 충분히 합성제품과 경쟁하여 국내수입 대체는 물론 수출까지 가능하다고

판단된다. 그러나 국내에서는 아직까지 생물학적 공정에 의한 biotin 생산에 관한 연구가 수행되지 않고 있으며 또한 기존의 연구 결과들 역시 유기 합성법을 완전히 대체할 만큼의 수준은 되지 못하는 것으로 판단된다. 따라서 국내에서 biotin의 생물적 생산 기술을 확보하기 위하여 연구 투자가 필요한 상황이며 경쟁사의 기술력을 앞서기 위해서는 보다 심도 같은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

### 3. 미생물을 이용한 해외 비오티ن 기술 개발 현황

해외 선진국에서는 생물학적 공정을 이용한 biotin 생산에 관한 연구 및 특허가 다수 보고 되었지만(표5) 아직 구체적으로 상업화를 완성한 회사는 아직 없는 것으로 알려져 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면 생물학적 공정에 의한 biotin의 생산성이 가장 높은 경우는 Kyowa에 에서 개발한 *Pseudomonas*로 발효농도가 2g/L에 달하며, Tanebe에서 개발한 *Serratia marcescense*를 이용한 경우에는 1g/L에 달하는 것으로 알려져 있다.

표 5. 바이오틴을 생산하는 미생물 및 특허

microorganism	biotin yeild (g/l)	Reference (comany, patent)
<i>Serratia marcescense</i>	1.0	Komatsubara saburo 1994 (Tanabe, US537455)
<i>E.coli</i>	0.55	Kawamoto Tonohiro 2001 (shisiedo and takeda, JP19950285761)
<i>Pseudomonas</i>	2.0	Yagasaki makoto 1999 (Kyowa soda, JP11285385)
<i>Sphingomonas sp.</i>	0.17	Kawabe tomoyasu 1999 (Sumitomo, JP11276175)
<i>Brevibacterium flavum</i>	0.2	Kawabe tomoyasu 1995 (Mitsubishi, JP7177895)



## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1. 균주개발

#### 1) 사용배지 및 배양 조건

##### 가) Seed 배지 및 배양 조건

성분	사용량
A part	
Urea	5 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/L
Yeast extract	10 g/L
CSL	5 g/L
GE 304	0.5 g/L
H <sub>2</sub> O	800 ml
pH	7.5
B part	
Sucrose	30 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g/L
H <sub>2</sub> O	200 ml

##### -배지 조제 방법

A part와 B part를 각각 살균 후 사용직전에 Clean bench에서 혼합 후 살균이 완료된 500 ml Flask에 A part 배지와 B part 배지를 4:1 비율로 30 ml씩 분주하여 사용한다.

##### -Seed 배양 조건

배양온도: 30 °C, RPM: 220

b. Main 배지 및 배양 조건

성분	사용량	Flask (30ml 배양액)	5L 발효조 (3.5L 배양액)	50L 발효조 (35L 배양액)
A part Urea K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Yeast extract CSL FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O GE 304 H <sub>2</sub> O pH	15 g/L 1 g/L 5 g/L 4 g/L 0.1 gr/L 0.5 g/L 800 ml 7.5	A part 24 ml	52.5 g/L 3.5 g/L 17.5 g/L 14.0 g/L 0.35 gr/L 1.75 g/L 2,800 ml 7.5	525 g/L 35 g/L 175 g/L 140 g/L 3.5 gr/L 17.5 g/L 28,000 ml 7.5
B part Sucrose MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	100 g/L 2 g/L 200 ml	B part 6 ml	350 g/L 7.0 g/L 700 ml	3,500 g/L 70 g/L 7,000 ml
Feeding solution Sucrose MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	500 g/L 2 g/L 0.1 g/L 1,000 ml		250 g/L 1 g/L 0.05 g/L 500 ml	2,500 g/L 10 g/L 0.5 g/L 5,000 ml
배양 조건		배양온도: 30°C RPM: 220-270	배양온도: 30°C pH: 7.3 control (28% NH <sub>4</sub> OH, 5N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) DO: 20% 기준으로 RPM 및 aeration 변경	

## 2). 돌연변이기술을 이용한 비오틴 균주개발

모균주 *S. marcescens* 8000균주를 이용하여 자외선을 이용한 돌연변이를 실시 함. 치사율 99.9% 이상이 되는 조건으로 자외선 조사 시간은 40초에서 70초 사이를 실시하였으며, 각각 돌연변이를 통하여 40균주씩 돌연변이 균주를 선별 함. Biotin operon은 final product인 biotin에 의해 feedback inhibition 받는다고 알려져 있다. biotin 생산량을 증대 시키고자 feedback inhibition 받지 않는 균주를 U.V mutation을 통해 선별하였다. biotin analogue인 acidomycin-resistant mutants를 선별하기 위해 돌연변이주를 2mg/ml의 농도의 acidomycin이 포함된 minimal agar plate에 plating 하였다. 30℃에서 5일동안 incubation 한 후 single-colony를 isolation 하여 acidomycin resistant한 균주를 선별하고 bio-assay법을 통하여 확인하였다. 3회에 걸쳐서 돌연변이를 통하여 선별된 120균주를 기본 main 배지 및 삼각 flask를 이용하여 우수균주 후보로 예상되는 5균주를 선별하여 최종적으로 MDB-a 균주를 선별함. MDB-a 균주(s.r-a)는 유전공학 기술을 이용한 균주개발을 위한 모균주로 제공 됨. 이후 바이오엠엔디는 MDB-a 균주를 이용하여 또다른 U.V 돌연변이를 실시하여 Table 1과 같이 MDBM1 및 MDBM2 균주를 개발 함.

Table 1. U.V 돌연변이 기술을 이용하여 개량된 균주 목록

균주명	개발방법	유전적 특징	Flask 농도* (5L 발효조)	개발주체
<i>S. marcescens</i> 8000		wild type	0.08 g/L	-
MDB-a(s.r-a)	UV 돌연변이	Acidomycin 내성	0.6 g/L (1.0 g/L)	콧데 (바이오엠엔디)
MDBM1	UV 돌연변이	MDB-a균을 Host로 사용 함	0.9 g/L (1.55 g/L)	콧데 (바이오엠엔디)
MDBM2 (MDBM1-u-27)	UV 돌연변이	MDBM1을 Host로 사용함	1.50 g/L (2.60 g/L)	콧데 (바이오엠엔디)

## 3) 유전공학기술을 이용한 비오틴 균주개발

### 가) biotin 생합성 유전자 분리 확보 및 cloning 및 동정

*Serratia marcescens* 의 wild type인 s.r 8000 과 acidomycin-resistant mutants인 s.r-a 의 biotin 합성에 관련된 유전자를 분리하고자 하였다. biotin합성에 관련된 유전자 *bioA*, *bioB*, *bioF*, *bioC* *bioD* 는 operon 형태로 cluster 되어있음을 확인 하였다.

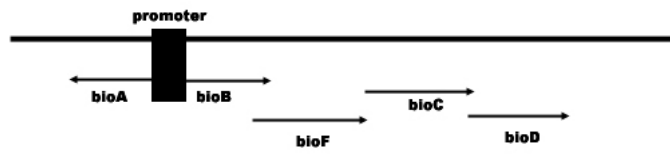


Figure 1. *S.marcescens* 의 biotin operon 의 구조

위의 biotin operon을 분리하기 위해 s.r 8000의 sequence를 바탕으로 primer를 제작 후 아래와 같이 biotin cluster를 bio1과 bio2로 나누어 PCR을 수행하였다.



Figure 2. biotin operon을 cloning 하기 위한 recombinant PCR 방법

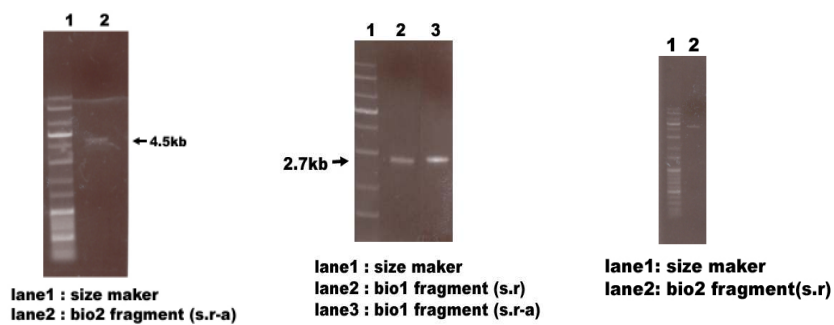


Figure 3. PCR을 이용하여 증폭한 biotin operon 유전자 fragment(bio1 and bio2)

Wild type(s.r 8000) 돌연변이주 (s.r-a) 로부터 bio1, bio2 (s.r ,s.r-a) 의 fragment를 아래의 strategy에 따라 T-vector에 ligation 시켜 biotin operon을 완성하였다.

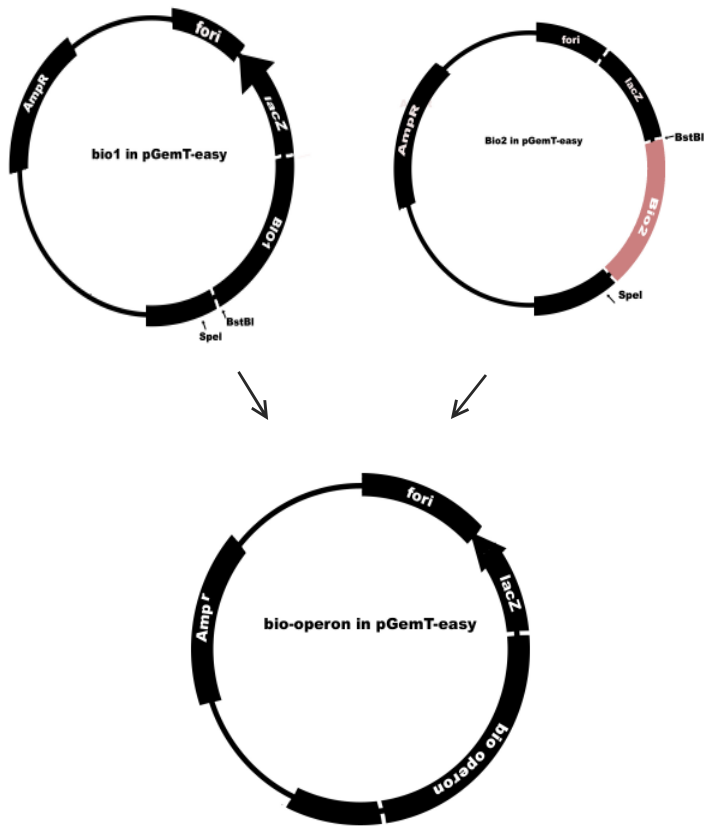


Figure 4. biotin operon이 cloning 된 재조합 vector

Biotin operon의 제한효소 분석을 수행하였다. 그 결과 아래의 그림과 같이 각 fragment의 cloning이 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 확인된 biotin operon을 pBR322 vector의 *E.co*R1 과 *Hind*III site로 ligation 하였다.

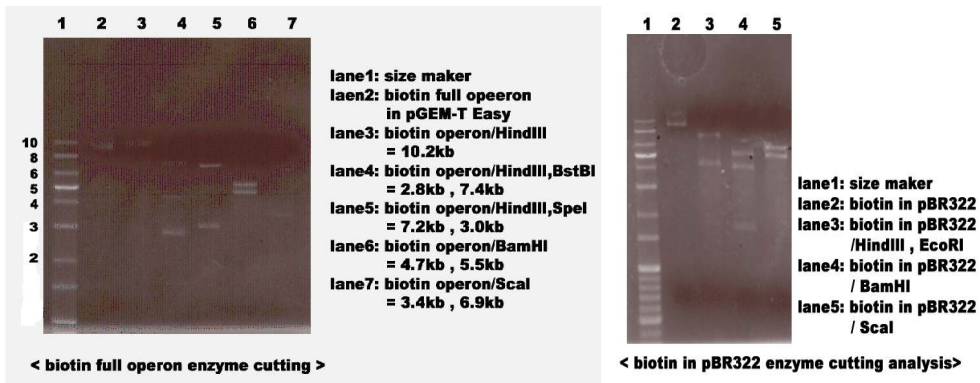
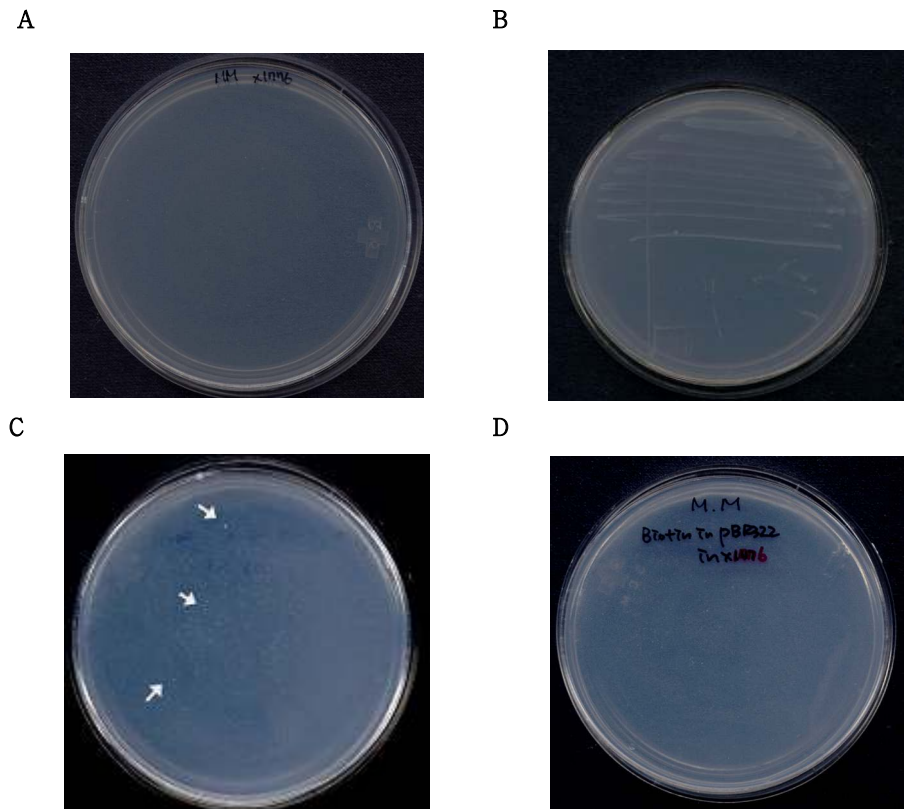


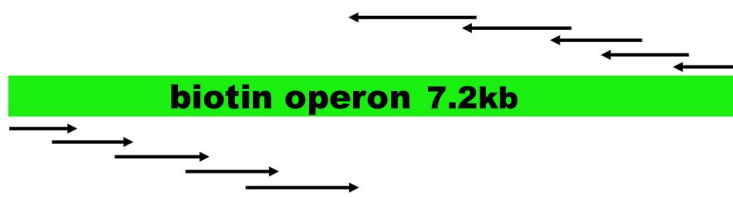
Figure 5. Cloning 한 biotin operon의 제한효소 분석

Cloning 한 biotin operon 의 발현을 알아보기 위해 biotin auxotroph *E. coli* x1776을 이용하여 complementation test를 수행 하였다. 아래 그림에서 볼 수 있듯이 cloning 된 biotin operon이 발현이 됨을 확인할 수 있었다.



**Figure 6.** *E. coli* x1776을 이용한 biotin complementation test  
 A: *E. coli* x1776 in Minimum media-biotin,  
 B: *E. coli* x1776 in Minimum media+100ng/ml biotin,  
 C: pWbioBR322 in Minimum media,  
 D: pMbioBR322 in Minimum media

나) s.r 과 s.r-a의 biotin operon의 full sequencing

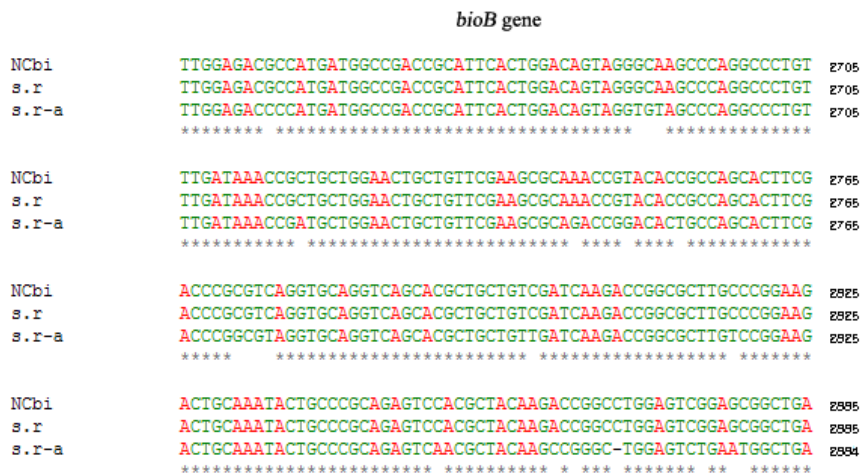


**Figure 7.** 유전자 염기서열 분석 strategy

10개의 primer를 이용한 priming sequencing 방법을 통해 cloning 한 biotin operon의 full sequencing을 수행하였다. Cloning한 wild type sequence (s.r8000 biotin operon)는 NCBI s.r 8000 biotin operon sequence와 비교 결과 100% homology를 보였으며 돌연변이주의 sequence와는 96% homology를 보였다.

**Table 1.** Cloning 한 biotin operon들의 Sequence Homology 비교

	NCBI
NCBI	—
<i>s.r</i> 8000	100%
<i>s.r-a</i>	96%



**Figure 8.** *bioB* 유전자의 염기서열 비교

**다) 재조합 *Serratia marcescens* 균의 biotin-assay를 통한 biotin 생성량 비교**

Biotin 생산량을 알아보기 위해 biotin indicator strain인 *Lactobacillus .plantarum* 을 이용하여 biotin assay를 수행하였다. Wild type s.r 8000 에 각각의 pWbioGemT, pWbioBr322 , pMbioGemT, pMbioBR322를 cloning한 재조합균주와 mutant s.r-a 로 pWbioGemT, pWbioBr322, pMbioGemT, pMbioBR322를 cloning 한 재조합 균주를 LB배지에서 배양 후 bio-assay를 수행한 결과 아래와 같은 양상을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 그 결과 s.r-a에 wild type operon을 도입하였을 경우 가장 높은 biotin 생



성을 보이는 것으로 나타났다.

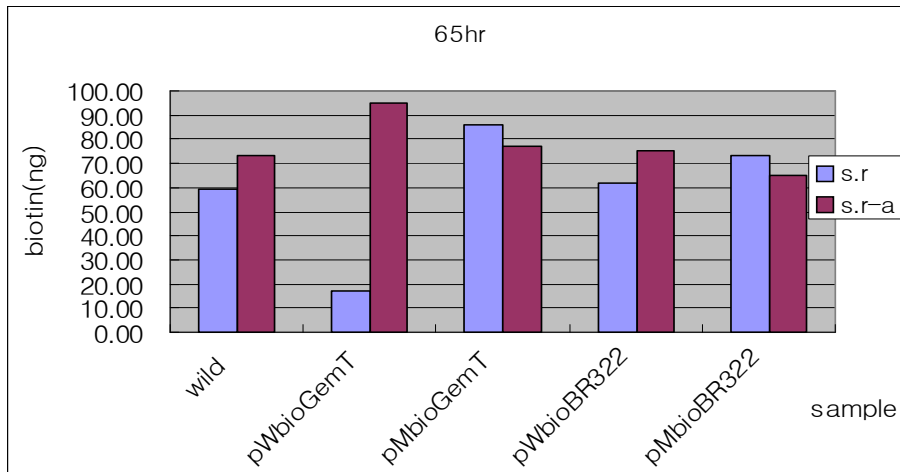


Figure 9. Bio-assay에 의한 재조합 균주의 biotin 생성량(ng/ml)

#### 라) 발현 기구 및 조건개발

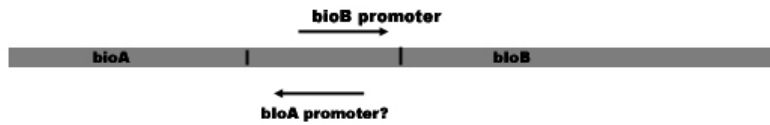


Figure 10. Biotin operon의 발현 조절 기구의 구조

*bioA*와 (*bioA* promoter+*bioA* ORF)와 *bioB* (*bioB* promoter+*bioB* ORF)를 각각 cloning 하여 *bioA*와 *bioB*가 encoding 하는 enzyme 의 assay를 수행하며 이를 바탕으로 2차년도에 발현기구 조절에 대한 연구를 수행해 나갈 예정이다.

2절. 2차 우수 균주 개발

마) 핵심 유전자 과발현에 의한 biotin 생성량 증대 연구

(1) *bioA*, *bioB* 유전자 copy 증대 및 발현증가 biotin 생성에 미치는 영향

(가) *bioA*, *bioB* 유전자의 분리, cloning 및 발현

Biotin operon을 구성하는 유전자 중 *bioA*와 *bioB* 유전자를 cloning 하고 이것의 발현이 biotin 생성량에 어떠한 영향을 미치는 지 연구 하였다. Biotin synthesis pathway(Figure 12) 에서 *bioA*와 *bioB* 유전자는 각각 DAPA synthase 와 biotin synthase를 coding 한다. 이 두 유전자는 biotin operon (Figure 11)에서 중요한 regulatory role 을 수행하는 유전자로 알려져 있고 gene transcription 이 서로 반대 방향이며 central regulatory system 을 공유하고 있으나 이용하는 strand 가 다른 것으로 알려져 있다. 이들 유전자의 regulation mechanism 을 보면 Figure 13과 같이 cell 내에 biotin concentration 이 높을 경우 BirA-biotinyl-5'-AMP complex 가 *bioB* 와 *bioA* regulatory region 에 binding 함으로써 두 유전자의 발현을 억제한다.

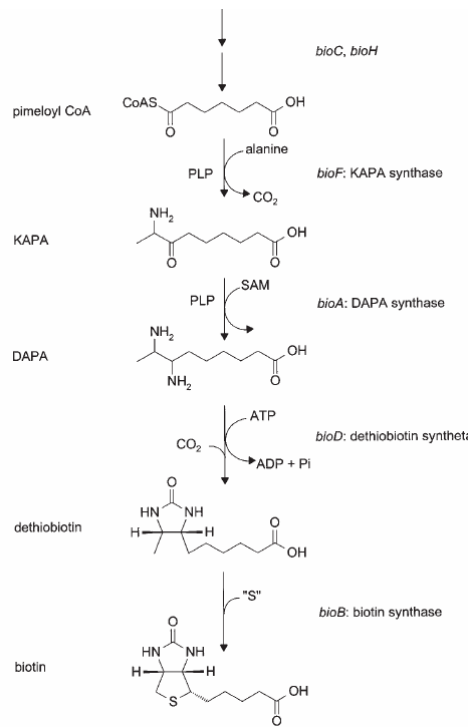
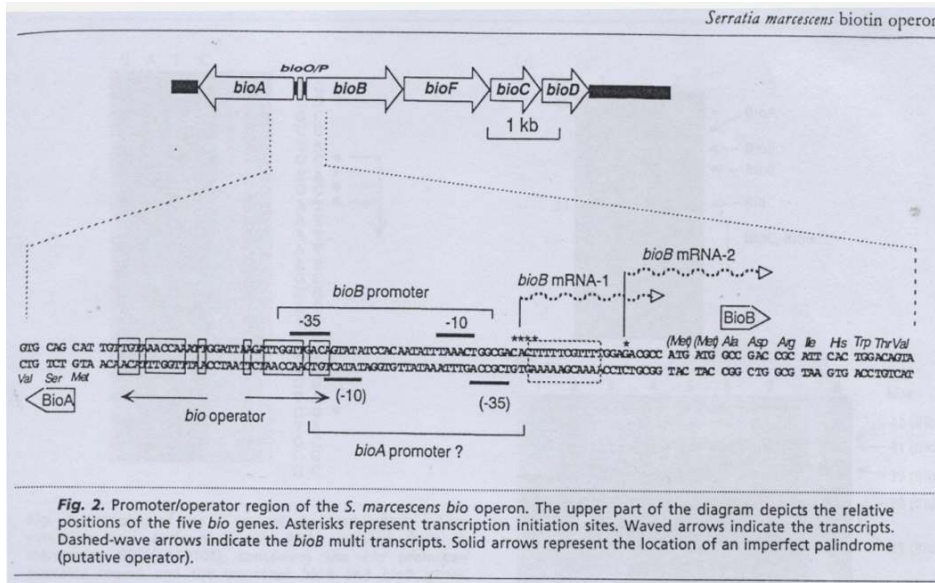
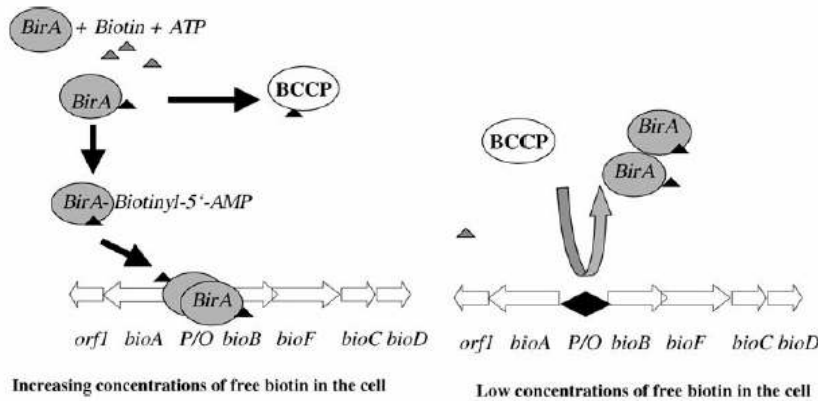


Figure 11. Biosynthetic pathway of biotin synthesis in *Serratia marcescens*



**Figure 12.** Structure of biotin operon. *bioA* and *bioB* are regulated by common regulatory sequence but the transcription direction is opposite.

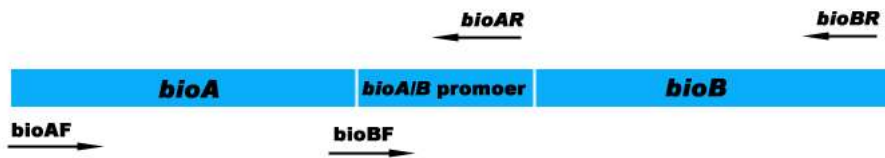


**Figure 13.** Regulation mechanism of biotin operon

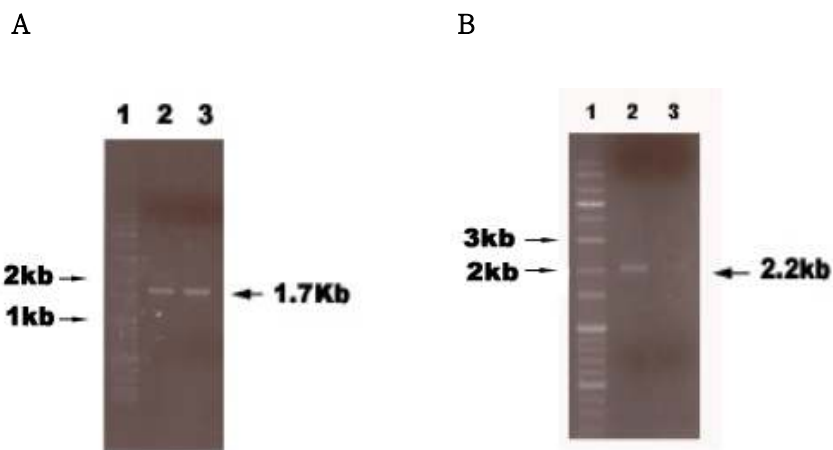
본 연구에서는, 따라서, 이 두 유전자의 regulatory gene 을 다른 promoter 로 대체함으로써 유전자의 발현을 증대하고 이때 이 유전자의 강화가 biotin 생성에 미치는 영향을 분석하였다.

우선 *S. marcescens* wild type 균주와 biotin 고생산 돌연변이 균주인 *S. marcescens*-a (sr-a) 균주로부터 *bioA*와 *bioB* ORF와 promoter를 포함한 부분을

bioAR 과 bioAF, bioBR 과 bioBF primer set 를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였고 (Figure 14, Figure 15) 이것을 T-vector에 ligation 하였다.(Figure 16) 이 recombinant plasmid중 wild type 균주로부터 증폭된 *bioA*를 가진 plasmid를 pbioAWG, mutant *bioA*를 가진 plasmid 는 pbioAMG 로, 또한 wild type *bioB*를 가진 plasmid를 pbioBWG, mutant *bioB*를 가진 plasmid 를 pbioBMG 라고 명명하였다. Figure 16는 각각의 plasmid 의 구조를 나타낸다.

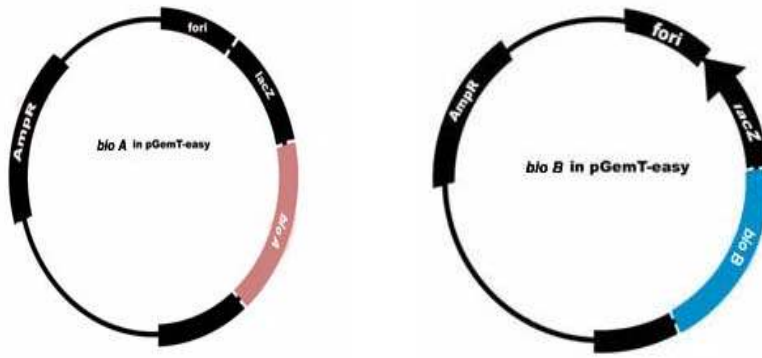


**Figure 14.** Strategy of PCR for the amplification of *bioA* and *bioB* Primer *bioA*(5'CACCGATCGATCTGATGGCGG), *bioAR*(5'CAGATCGATCGGTGAGATCGC), *bioBF*(5'CATGATGGCCGACCGCAT) and *bioBR*(5'CATTTCAGCACCTCCAGCAG) were used.



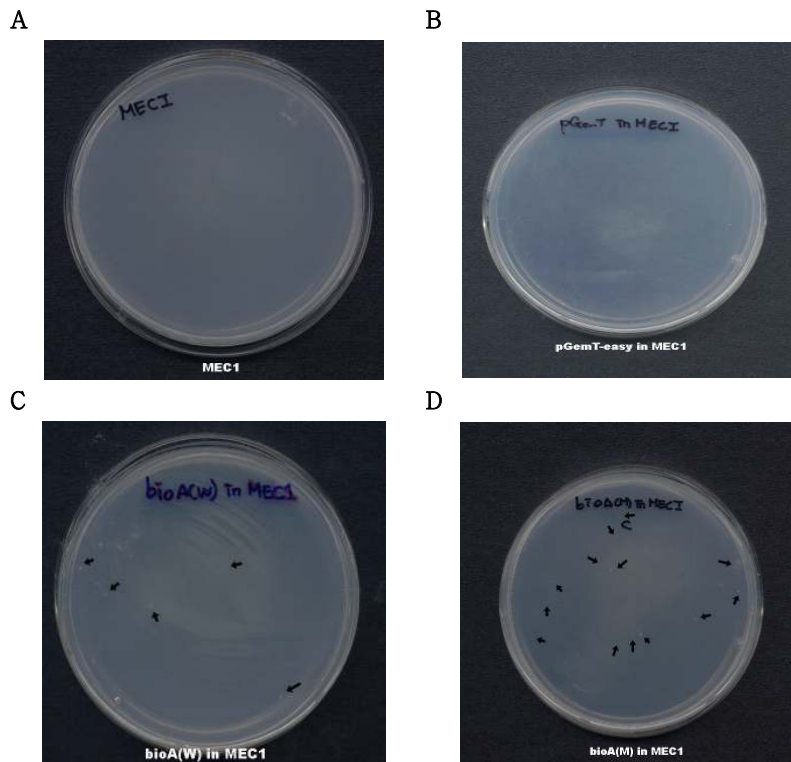
**Figure 15.** Restriction analysis of *bioA* and *bioB* after PCR

- A. PCR product of *bioA* ;
  - lane1: size marker, lane2: *bioA* from wild type strain,
  - lane3: *bioA* from mutant strain
- B. PCR product of *bioB* ;
  - lane1: size marker, lane2: *bioB* from wild type strain,
  - lane3: *bioB* from mutant strain



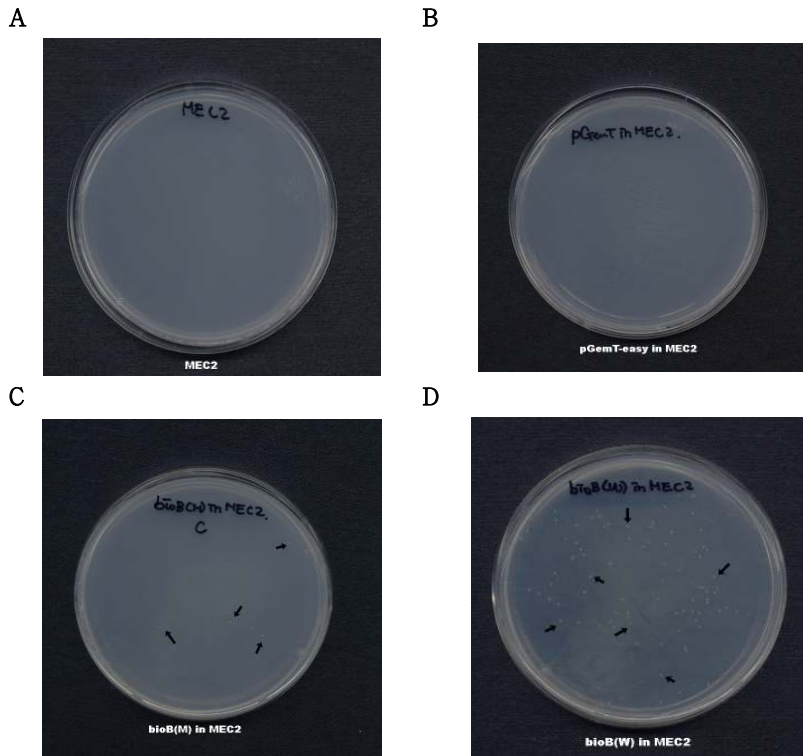
**Figure 16.** Structure of recombinant plasmids containing *bioA* or *bioB* from wild type *S. marcescens* 8000 or *S. marcescens*-a.

이 후 이 recombinant plasmid가 활성을 나타내는지 알아보기 위해 *bioA* auxtroph 인 *E. coli* MEC1과 *bioB* auxtroph 인 MEC2를 이용한 complementa- tion test를 수 행하였다. 그 결과 *bioA*, *bioB* 가 도입되어 발현된 MEC1, MEC2 균주에서는 colony 가 형성되었다. 이 결과로서 본 연구에서 cloning한 *bioA*, *bioB* 유전자가 발현되어 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Figure 17, Figure 18).



**Figure 17.** Complementation test of *E. coli* MEC1 by recombinant plasmids

A: MEC1 (control),      B: MEC1(pGemT).  
 C: MEC1 (pbioAWG),    D: MEC1(pbioAMG)



**Figure 18.** Complementation test of *E. coli* MEC2 by recombinant plasmids harboring *bioB*.

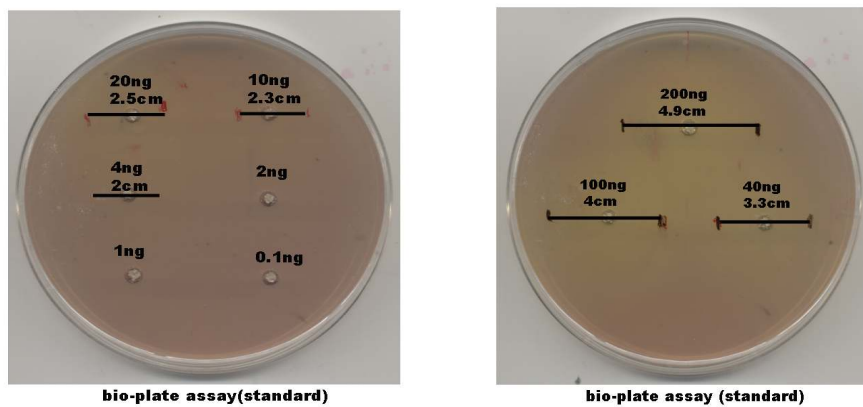
A: MEC2 as control,    B: MEC2 (pGemT),  
 C: MEC2 (pBioBWG),    D: MEC2 (pBioBMG)

**(나) *bioA* 와 *bioB* copy 증대에 따른 발현 증가가 biotin 생성에 미치는 영향**

이들 recombinant plasmid를 biotin 고생산 돌연변이균주인 *S. marcescens*-a strain 으로 역도입 하여 biotin 생성에 미치는 이들 두 유전자의 영향을 조사하였다. *S. marcescens* 에서 biotin 생산을 유도하기 위해 사용한 production 배지는 10% sucrose, 1.0% urea, 0.5% corn steep liquor, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01% FeSO<sub>4</sub>, 0.02% CaCO<sub>3</sub>, 0.2% MgSO<sub>4</sub> 가 포함된 배지이며 30°C에서 7일 동안 200 rpm에서 배양하였다.

Bio-assay를 위한 고체 배지는는 Biotin assay media (Difco) 와 1.75% agar powder, 0.002% bromophenol 을 넣은 후 auto-clave (121°C 5min) 한 후 50°C 로 식힌 다음 *Lactobacillus plantarum*을 넣어 섞은 다음 만들었다. 이 후 plate 중앙에 0.5 cm 구멍을 낸 뒤 *S. marcescens* 배양액 10 µl를 넣어주었다. Plate를 37°C에서 20시간 incubation 한 후 생겨난 yellow zone을 standard zone과 비교해서 biotin의 양을 구하

였다. Figure 19은 biotin 농도에 따른 halo의 크기를 나타낸다.



**Figure 19.** Standard bio-plate assay of biotin according to biotin concentration. Halo size is proportional to the concentration of biotin.

배양한 재조합 균주를 이용하여 biotin 생성량을 bio-plate assay를 통해 확인 해 본 결과 *bioA* 유전자 보다는 *bioB* 유전자가 biotin 생성량을 높이는데 많은 영향을 미침을 알 수 있었다. (Table 2)

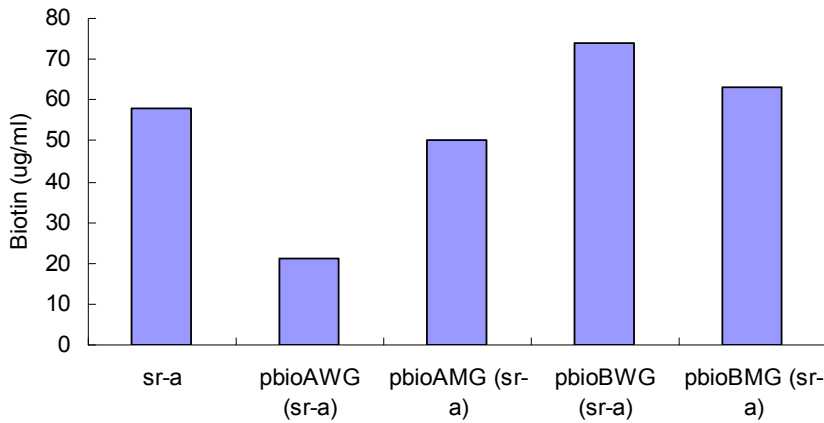
**Table 2.** D-Biotin production by recombinant *S. marcescens*-a containing plasmids containing *bioA* and *bioB*

	Growth (OD600nm) <sup>a</sup>	Biotin (ug/ml) <sup>b</sup>	Relative biotin conc.(%)
sr-a	12	130	100
pbioAWG	8	36	28
pbioAMG	6	78	60
pbioBWG	12	157	121
pbioBMG	7	135	103

a. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30°C with shaking at 200rpm for 120 hr. At the indicated time point cells were collected and measured OD at 600nm

b. Concentration of d-biotin was determined by HPLC.





**Figure 20.** Comparison of d-biotin production by several recombinant *Serratia* strains harboring plasmids containing *bioA* or *bioB*. Strains having *bioB* gene showed more production of biotin than those of *bioA*. sr-a: mutant *S. marcescens*-a. All plasmids were maintained in sr-a by back-transformation to the strain. Biotin concentrations are the mean value of 5 times separate experiments.

Table 1에서 보는 바와 같이 *bioA*를 가진 재조합 균주는 *bioA*가 wild type 으로 부터나 혹은 mutant sr-a 로부터 온 것이냐를 막론하고 오히려 biotin 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 *bioA* 가 DAPA 를 합성하는 단계에 관여하는데 이 효소는 S-adenosylmethionine 을 substrate 로 사용하기 때문에 biotin 생합성에 직접 관여하지 않는 SAM synthesis pathway 에 영향을 미치기 때문인 것으로 사료되나 심도 있는 연구를 더 진행하여야 할 것으로 생각된다. *bioB* 유전자의 copy 수가 증대되어 BioB가 많이 발현되면 biotin 생성량은 50% 이상 증대되는 효과를 보였다. 이는 BioB (biotin synthase)가 biotin synthesis pathway 의 마지막 step으로서 dethiobiotin 을 biotin 으로 전환시키는 역할을 하며 따라서 과 발현된 이 효소가 이 step의 반응을 효율적으로 일으키는 것으로 생각된다. 그러나 Figure 20 에서 보는 것처럼 wild type BioB 가 mutant BioB 보다 더 높은 biotin 생성에 관여하는 것은 좀 더 연구를 학문적으로 진행하여야 밝혀질 것으로 생각되나 본 과제의 주 목적에서 다소 벗어나기 때문에 본 과제에서는 여기에 관해서는 더 이상의 연구를 진행하지 않았다.

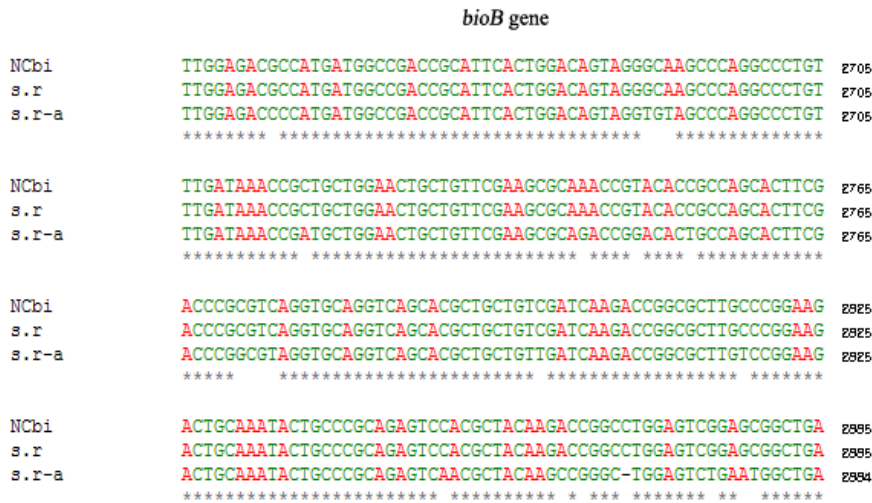


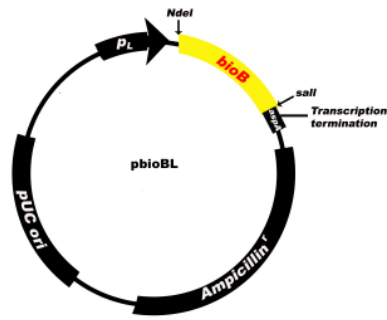
Figure 21. Comparison of nucleotide sequences between wild type and mutant *bioB*.

왜냐하면 mutant *bioB* 는 wild type *bioB*와 그 염기 서열이 다르고 (Figure 21), BioB 또한 end product 인 biotin으로부터 feed-back inhibition 이 해제된 것으로 본 연구에서 이미 밝혀졌기 때문이다.

결론적으로 biotin 합성 단계 중 dethiobiotin에서 biotin으로 전환되는 과정이 key step이라고 보고된 바와 같이 본 연구에서, *bioB* 유전자를 도입하여 유전자 copy 를 증대시킨 결과 dethiobiotin에서 biotin으로 전환되는 빈도가 증가 되었고 이것으로 인해 biotin 생성량이 증가된 것이라 사료된다.

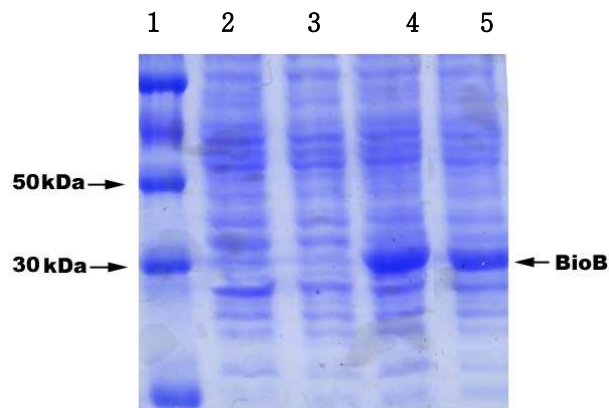
## (2) *bioB* 유전자의 과잉 발현이 biotin 생성에 미치는 영향

*bioB* copy 수의 증가에 따른 *bioB* 발현 증대가 biotin 생성량을 증가 시키는 것으로 나타났으므로 *bioB* 유전자를 강력한 promoter 하에서 발현시켜 발현을 획기적으로 증가시킨 후 biotin 생성량의 증가를 시도하였다. 사용한 promoter는 PL promote이다. pL promoter를 가지고 있는 pLEX vector를 *NdeI* site 로 절단한 후 *bioB* 유전자를 삽입 시켰다. *bioB* origin 에 따라 이 recombinant plasmid를 각각 p*bioB*WL(having wild tyupe *bioB*), p*bioB*ML(having mutant *bioB*) 으로 명명하였다. Figure 22은 이 재조합 vector의 공통적 구조를 나타낸다.



**Figure 22.** Structure of pbioBL containing the *bioB* gene. *bioB* is located under the control of strong promoter P<sub>L</sub>.

이 후 pL promoter 하에서 *bioB* 유전자가 제대로 발현하는지 확인하기 위해 *E. coli* JM109 strain에서 발현을 유도하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과 *bioB* 유전자가 과잉 발현되는 것을 확인 하였다 (Figure 23).



**Figure 23.** SDS-PAGE analysis of expressed BioB. *E. coli* JM109 was used as host for the expression of the *bioB* under the P<sub>L</sub> promoter.

- Lane1 : Size marker
- Lane2 : *E. coli* JM109
- Lane3 : cells harboring pLEX as control
- Lane4 : cells harboring pbioBWL
- Lane5: cells harboring pbioBML

이 후 pbioBWL과 pbioBML를 biotin 고생산 균주인 돌연변이주인 *S. marcescens* MDBM1 (sr-MDB)균주에 형질 전환하고 발현을 유도하여 biotin 생성량을 bio-assay

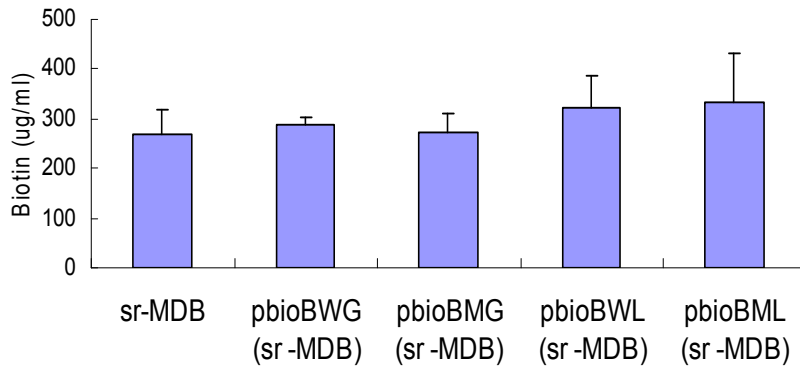
와 HPLC를 통해 정량하였다. HPLC (Waters 5300)는 C18 reverse phase column 이 용하였다. 전개시약으로는 photassum phosphate buffer (3  $\mu$ M)/ Acetonitrile을 90:10 (v/v) 으로 하여 사용하였다. 그 결과 bioB가 self promoter 하에서 발현 시켰을 때 보다 PL promoter 하에서 발현 시켰을 때 biotin 생성량이 20% 이상 증가하였다 (Table 2, Figure 24). 그러나 pbioBWG 를 가진 균주가 pbioBWL 을 가진 균주에 비해 성장 속도가 빠른 것으로 볼때 bioB 의 과잉 발현이 bacteria의 성장을 저해 한 것으로 보인다. 따라서 성장 속도를 고려하여 biotin 생성량 ( $\mu$ g/OD/ml)을 비교하면 1.6 배 생산성이 증가 하였다. 그러나 성장 속도는 배지나 배양조건 등에 따라 영향을 받으므로 좀 더 많은 연구가 필요하다. Figure 24에서 보는 바와 같이 pbioBWL을 가진 균주에서 가장 높은 biotin 생성량을 나타내었다. 이는 자신의 promoter 하에서 *bioB*가 발현되었을 때 , 즉 pbioBWG 의 경우 (Figure 20)와도 일치하는 결과로서 mutant *bioB* 를 가진 균주 보다 더 많은 biotin 이 발현되는 이유는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 그리고 콧테(바이오옴엔디)에서 MDBM1 균주는 flask 배양 에서 600 ug/ml 이상 biotin 농도를 기록하였지만 당 실험실에서 생산성이 낮게 나타나는 것은 사용하는 shaker의 구조적 차이로 인한 것으로 판단된다.

**Table 3.** D-Biotin production by recombinant *S. marcescens* MDBM1 containing several plasmids.

	Growth (OD600nm) <sup>a</sup>	Biotin (ug/ml) <sup>b</sup>	Relative conc.(%)
MDBM1	14	204	100
pbioBWG	20	254	124
pbioBMG	17	228	22
pbioBWL	15	296	144
pbioBML	14	248	121

a. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30°C with shaking at 200rpm for 144hr. At the indicated time point cells were collected and measured OD at 600nm

b. Concentration of d-biotin was determined by HPLC.



**Figure 24.** D-Biotin production by mutant *S. marcescens* MDBM1 harboring pbioBG and pbioBL. Biotin concentrations are the mean value of 4 times separate experiments.

한편 biotin 생성량의 증가가 BioB (biotin synthase) 의 발현 증가에 의한 것임을 알아보기 위하여 in vitro biochemical assay를 수행하였다. BioB enzyme assay는 cell free extract (25 mg/ml), 1 mM dethiobiotin (substrate), 1 mM NADPH (cofactor), 0.1 mM SAM (S-adenosyl methionine: cofactor), 1 mM Fe(II)-gluconate, 2 mM DTT (anti-oxidant), 0.2 mM PMSF (protease inhibitor)를 100mM Tris-HCl (pH 7.5) 에 첨가한후 500  $\mu$ l 로 맞추었다. 이후 37  $^{\circ}$ C에서 1~3hr incubation 시켜 enzyme reaction 시켜 centrifugation 한 후 위의 supernatant를 얻고 이를 이용하여 bio-assay를 수행하여 yellow zone을 확인하였다. Enzyme assay 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 wild type *bioB*를 포함한 plasmid 인 pbioBWL을 가진 균주에서 mutant *bioB* 유전자를 포함한 pbioBML을 가진 균주보다 enzyme activity가 가장 높음을 확인 할 수 있었다.

**Table 4.** Enzyme assay of BioB in recombinant strain *S. marcescens* MDBM1 harboring plasmid pbioBWL or pbioBML.

time(hr) \ biotin conc.	biotin formed (ng/ml)		
	MDBM1	MDBM1/pbioBWL	DBM1/pbioBML
0	0	0	0
1	10.0	5.18	3.90
3	10.0	93.0	88.2

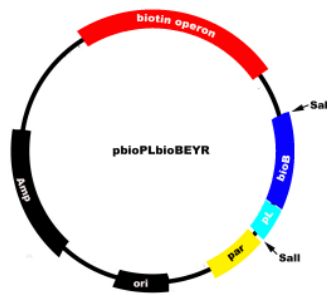
이 결과는 biotin 생성량을 보인 Figure 24 과 일치하는 것으로 biotin 생성량의 증가가 *bioB*의 과잉 발현에 기인한다는 것을 나타낸다. 결론적으로 enzyme activity가 높

은 BioBW를 합성하는 wildtype *bioB* 유전자의 과잉 발현이 biotin 생성량을 높이는 데 큰 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. pbioBML이 발현된 균주의 경우는 BioB의 활성도 낮을 뿐 아니라 growth가 저해되고 또한 plasmid의 stability 도 낮아져 biotin 생성량이 증가되지 않은 것으로 사료된다.

**바) 재조합 plasmid 안정성 향상에 의한 biotin 생성량 증가**

**(1) *par* locus 도입에 의한 recombinant plasmid 안정성 향상 및 biotin 생성량 증가**

pbioEYR vector (has full biotin operon and *par* locus, constructed in this lab) 에 *bioB* 유전자를 도입한 recombinant vector를 제작하여 biotin 생성량을 높이고자 하였다. 우선 pbioEYR vector의 *Sall* site로 pL promoter를 포함한 *bioB*를 삽입 시켰다 (Figure 25). PL promoter 하에서 wild type *bioB* 가 발현되고 wild type biotin operon 과 *par* locus를 포함하는 plasmid를 pJEYR로 명명하였고, 여기에 mutant *bioB* 를 포함한 경우 pJMEYR이라고 명명하였다. PL promoter 하에서 wild type *bioB* 가 발현되고 mutant biotin full operon 과 *par* locus를 포함하는 plasmid 를 pJMEYR-R, mutant type biotin full operon과 PL promote 하에 mutant *bioB* 가 발현될 경우 pJEYR-R이라고 명명하였다.



**Figure 25.** Structure of recombinant pbioEYR plasmid

이들 recombinant plasmid를 *S. marcescens* MDBM1에 형질 도입 시킨 후 배양하여 relative plasmid stability (%)를 조사하였고, HPLC를 이용하여 biotin 생성량을 관찰 하였다 Plasmid stability는 antibiotics를 포함한 배지를 이용하여 측정하였다. 재조합 plasmid를 가지고 있는 *S. marcescens* 8000 (sr), *S. marcescens* MDBM1를 ampicillin(Ap)이 첨가된 배지에서 seed culture 한 후 Ap가 첨가되지 않은 배지에서 재접종 하였다. 30 °C에서 배양하면서 일정 시간마다 배양액을 취한다음 배양액을 적당히 희석한 후 Ap가 포함되지 않은 배지와 포함된 한천 배지에 각각 도말하여

colony 수를 비교하여 plasmid의 안정성을 알아보았다. 그 결과 PL promoter 하에서 wild type *bioB* 가 발현되고 wild type biotin full operon 과 *par* locus를 포함하는 plasmid (pJEYR-R)를 가진 균주 가 plasmid stability가 상대적으로 가장 높았다 (Table 4). 즉 *par* locus 를 도입하지않은 plasmid 들의 경우는 배양 후 36시간 이내에 거의 모든 plasmid 가 소실되었으나 *par* locus 를 도입한 경우 80-90% 의 stability 를 유지하고 있음을 알 수 있었다. 또한 biotin 생성을 위한 배양시간인 144 시간이 지난 후에도 50%이상 stable 하게 유지됨을 관찰 할 수 있었다 (Table 5). 또한 biotin 생성량 또한 가장 높게 나타남으로써 (Table 5, Figure 26) *par* locus 도입에 의해 plasmid stability 가 향상됨으로써 biotin 생성량이 증가되는 결과를 나타내었다.

**Table 5.** Plasmid stabilities of recombinant strains

Growth&Stabilities		Growth(hr) (OD600nm) <sup>a</sup>		Relative plasmid stability (%) <sup>b</sup>	
Strain		36	120	36	120
Time					
MDBM1		13	14	NT <sup>c</sup>	NT
pbioBWG		20	24	1.5	0
pbioBMG		8	2	28	0
pbioBWL		14	20	1.8	0
pbioBML		10	12	17	0
pJEYR		2	13	90	60
pJMEYR		15	17	94	54
pJMEYR-R		10	14	98	39
pJEYR -R		9	13	86	60

**Table 6.** D-Biotin production and plasmid stabilities of recombinant strains

	Growth (OD600nm) <sup>d</sup>	Biotin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Relative conc(%)	Plasmid stabilities (%) <sup>b</sup>
MDBM1	14	204	100	NT
pbioBWG	20	254	124	0
pbioBMG	17	228	22	0
pbioBWL	15	296	144	0.1
pbioBML	14	248	121	0
pJEYR	29	497	243	55
pJMEYR	20	258	126	50
pJMEYR-R	20	271	132	30
pJEYR -R	37	161	128	45

a. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30 °C with shaking at 200rpm. At each time point cells were collected and measured OD at 600nm.

b. Same number of cells were plated simultaneously on the LB agar medium with and without Ap. The ratio between the number of cells appeared in the agar medium with and without Ap was defined as the relative plasmid stability.

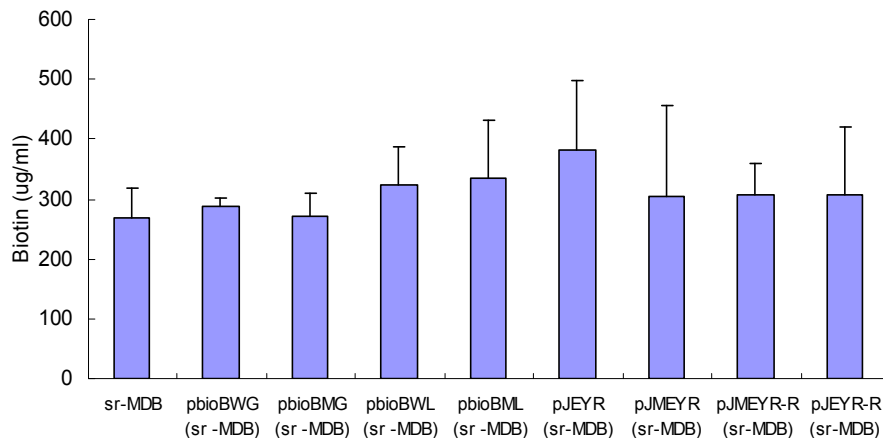
$$\text{Relative plasmid stability(\%)} = \frac{\text{\# of colonies with presence of Ap}}{\text{\# of colonies without Ap}} \times 100$$

c. NT, not tested.

d. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30°C which shaking at 200rpm for 144hr.

Biotin 생성량을 보면 pJEYR을 포함하는 균주에서 497  $\mu\text{g/ml}$ 의 높은 biotin 생성량을 나타 내었는데 (Table 5, Figure 26). 이 plasmid 는 PL rpomoter 하에 wild type *bioB* 가 과잉 발현되고 wild type biotin full operon 을 가지고 있으며 이를 biotin 고 생산 돌연변이 균주인 *S. marcescens* MDBM1 균주에 형질 도입하여 배양한 것이다. 이 결과는 앞서 서술한 결과들과 일치하는 것이지만 배양조건이나 배지조성에 따라 par locus가 도입된 균주들에서 높은 biotin 생성량을 보일 수 있을 것으로 예상된다.





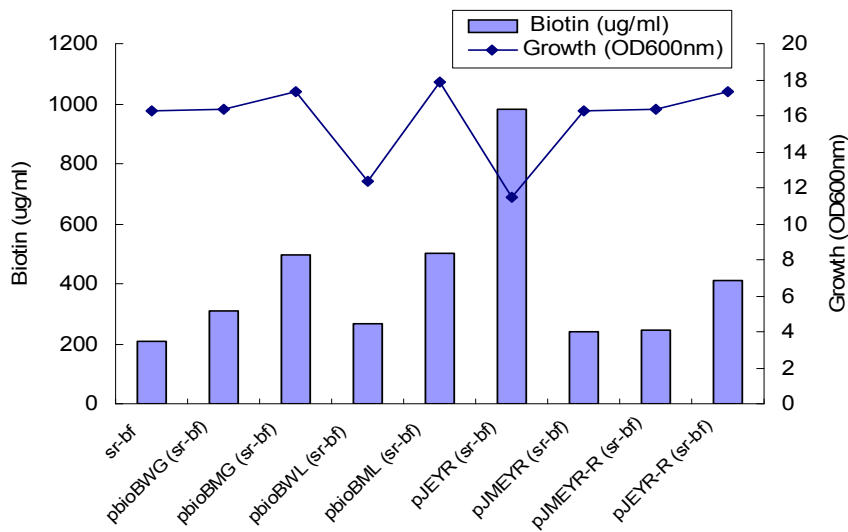
**Figure 26.** Production of d-biotin by recombinant *S. marcescens* MDBM1 harboring recombinant plasmids. Biotin concentrations are the mean value of 6 times separate experiments.

## (2) 항생제 첨가에 따른 plasmid stability 향상과 biotin 생성량의 증가

본 연구에서는 이들 plasmid 안정성이 증대된 균주를 지속적으로 분리, 안정화한 후 생산성이 높은 재조합 균주를 분리하였고 이를 순화, 고정화한 후 이를 *S. marcescens*-bf (sr-bf) 라 명명하였다. 본 연구실에서 제작한 recombinant plasmid에는 antibiotics marker로 ampicillin (Ap)이 존재하는데, 처음 seed culture로부터 production media에 배양액을 transfer할 때, ampicillin을 첨가하면 plasmid stability를 높여 이것이 biotin 생성량에 영향을 줄 것이라 생각된다. 따라서 transfer 시점에 ampicillin을 넣어준 다음 stability를 조사한 결과 sa-a 균주와 같이 배양후 48시간 후에 par locus를 도입한 경우 70% 이상의 높은 plasmid 안정성을 보였다 (Table 6). 이 균주를 배양하여 biotin 생성량을 HPLC를 통해 관찰한 결과 pJEYR을 포함하는 균주에서 979  $\mu\text{g/ml}$ 의 높은 biotin 생성량을 나타내었다 (Figure 27).

**Table 7.** Plasmid stability of recombinant strain sr-bf harboring plasmids

	Growth (OD <sub>600nm</sub> , 168hr)	plasmid stability (48 hr, %)
sr-bf	16.23	NT
pbioBWG	16.38	9.6
pbioBMG	17.37	10.1
pbioBWL	12.39	9.1
pbioBML	17.91	1.9
pJEYR	2.49	77.1
pJMEYR	16.23	72.1
pJMEYR-R	16.38	89.9
pJEYR-R	17.37	92.6



**Figure 27.** Comparison of Relative D-Biotin production between recombinant strains

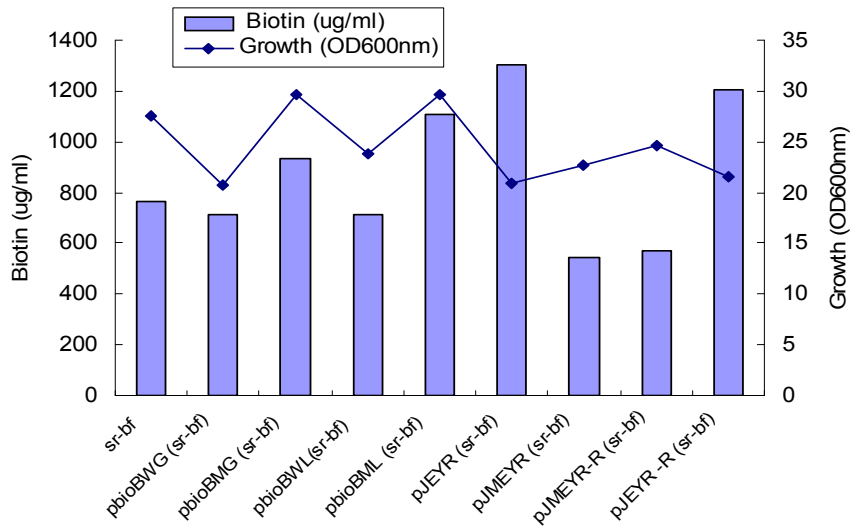
한편 배양 중 plasmid stability가 급격히 떨어지는 시점인 48시간째에 ampicillin을 첨가하면 이에 따라 plasmid stability가 높아져 biotin 생성량에 영향을 줄 것이라 생각되어 처음 seed culture 를 transfer 할 때가 아닌 배양 후 48시간 시점에 ampicillin을 넣어준 다음 biotin 생성량을 조사하였다. 그 결과 pJEYR을 포함하는 균주에서 1300-1600  $\mu\text{g/ml}$ 의 가장 높은 biotin 생성량을 나타내었다. 그러나 이 경우 plasmid stability가 sr-a 균주에 비해 상대적으로 매우 낮게 나타났는데 이는 sr-bf 균주의 특성이 sr-a 균주와 다름을 시사하는 것으로 향후 지속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 낮은 plasmid stability에도 불구하고 높은 biotin 생성량을 보인 것은 같은 재조합 균주라도 각 균주마다 발현 특성이 다르다는 것을 나타내고 있으며 따

라서 지속적인 고생산 재조합 균주의 선별을 요하는 것이기도 하다. 또 다른 하나의 가능성은 sr-bf 균주의 경우 지속적 선별 과정에 의해 재조합 균주가 extrachromosomal copy 로 가지고 있는 biotin operon이 host chromosome 내로 recombination 이 일어나 integration이 이어났음을 가정할 수 있다. 본 연구자는 이미 *Vibrio metschnikovii* 균주를 이용하여 alkaline protease를 고생산하는 재조합 균주를 만든 경험이 있는데 이때에도 역도입된 plasmid 가 host chromosome 내로 integration 되어 높은 생산성을 보인 재조합 균주를 isolation 한 경우가 있었다 (Chung et al, 2000. Development of a Novel Alkaline Protease and Lipase Suitable for Laundry detergent from *Vibrio metschnikovii* RH530. Proceeding of 5th World Surfactant Congress, Vol. 2. pp. 269-277. May 29-June 2, Fortezza da Basso, Firenze, Italy). 본 연구에서 biotin 재조합 균주를 수 세대 계대 배양하는 과정에서 이러한 가능성을 배제 할 수 없으며 결과적으로 biotin operon에 관련되는 전체 유전자 혹은 일부의 copy 수 증가와 안정적인 유지가 plasmid stability 와 상관관계가 크게 없이 biotin 생산성을 향상시켰을 가능성이 있다는 것이며 이는 지속적인 연구의 대상이다.

**Table 8.** Plasmid stabilities of recombinant strains after addition of ampicillin to the culture media

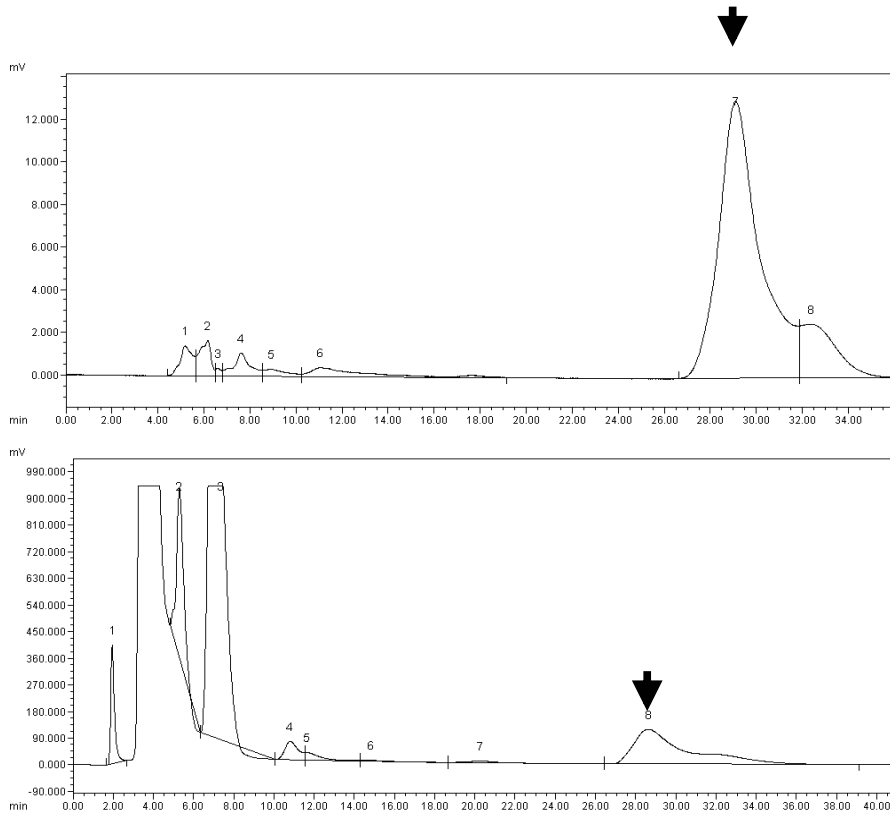
	Growth (OD600nm) <sup>a</sup>	Plasmid stabilities (%)
sr-bf	27.51	NT
pbioBWG	20.76	0
pbioBMG	29.64	0
pbioBWL	23.76	0
pbioBML	29.58	0
pJEYR	20.97	17.82
pJMEYR	22.68	0
pJMEYR-R	24.57	19.47
pJEYR-R	21.60	0

a. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30°C with shaking at 200rpm for 144hr. Cells were inoculated and cultured at 30°C. At each time point cells were collected and measured OD at 600nm



**Figure 28.** D-Biotin production of recombinant strains harboring recombinant plasmid after addition of ampicillin to the culture media

Figure 29은 HPLC 에 의한 biotin 분석 자료이다.



**Figure 29.** HPLC analysis of biotin production of recombinant *S. marcescens*-bf harboring pJEYR. Upper panel shows the standard (100 µg/ml) biotin and bottom panel shows the culture broth. The concentration scale is different between standard and sample. The same retention time is shown in the figure as shown by arrows.

### 사) Negative effect 유전자에 의한 biotin 생성량 연구

#### (1) *bioH* 유전자 copy 증대 및 발현 증가가 biotin 생성에 미치는 영향

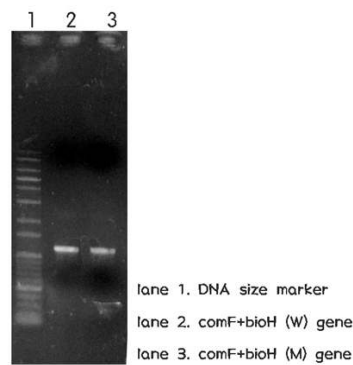
##### (가) biotin 합성에 관여하는 *bioH* 유전자 분리 확보 및 cloning 및 동정

biotin 합성에 관여한다고 알려진 *bioH* gene을 cloning 하고 *bioH* gene의 발현이 biotin 생성량에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. *bioH* gene은 bio operon과 cluster 되어있지 않지만 biotin operon의 precursor인 pimeloyl-coA의 합성에 관여한다고 알려져 있다. 따라서 *bioH* gene의 발현 증가가 biotin 생성량에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

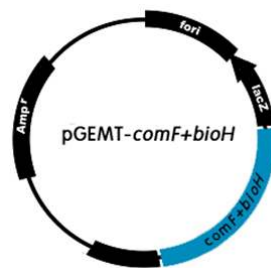
우선 *S. marcescens* 8000 wild type 균주와 biotin 고생산 돌연변이 균주인 *S. marcescens*-a 균주로부터 *bioH* ORF와 promoter를 포함한 부분을 *bioHR* 과 *bioHF* primer set 를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였고(Figure 30, Figure 31) 이것을 T-vector에 ligation 하였다.(Figure 32) 이 recombinant plasmid중 wild type 균주로부터 증폭된 *bioH*를 가진 plasmid를 p*bioHWG*, mutant *bioH*를 가진 plasmid 는 p*bioHMG* 라고 명명하였다. Figure 32는 plasmid 의 구조를 나타낸다.



**Figure 30.** Strategy of PCR for the amplification of *bioH* Primer *bioHF*(5'CATGATGGCCGCCGACCGCAT), *bioHR*(5'CATTTCAGCACCTCCAGCAG) were used.

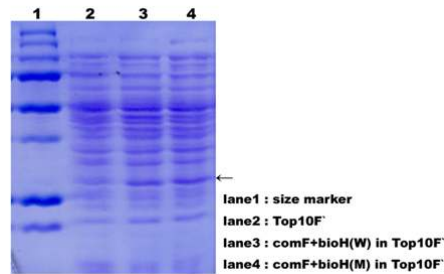


**Figure 31.** Restriction analysis of *bioH* after PCR



**Figure 32.** Structure of recombinant plasmids containing *bioH* from wild type *S. marcescens* 8000 or *S. marcescens*-a.

이 후 *bioH* 유전자가 제대로 발현하는지 확인하기 위해 *E.coli* JM109 strain에서 발현을 유도하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과 *bioH* 유전자가 과잉 발현하는 것을 확인하였다(Figure 33).



**Figure 33.** SDS-PAGE analysis of expressed *bioH*. *E.coli* Top10F' was used as host for the expression of the *bioH*

또한 이 recombinant plasmid가 제대로 활성을 나타내는지 알아보기 위해 *bioHABFCD* auxtroph 인 *E. coli* x1776 을 이용한 complementation test를 수행하였다. 그 결과 *bioH* 가 도입되어 발현된 x1776 균주에서는 colony가 형성되었다. 이 결과로서 본 연구에서 cloning한 *bioH* 유전자가 발현되어 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Figure 34).

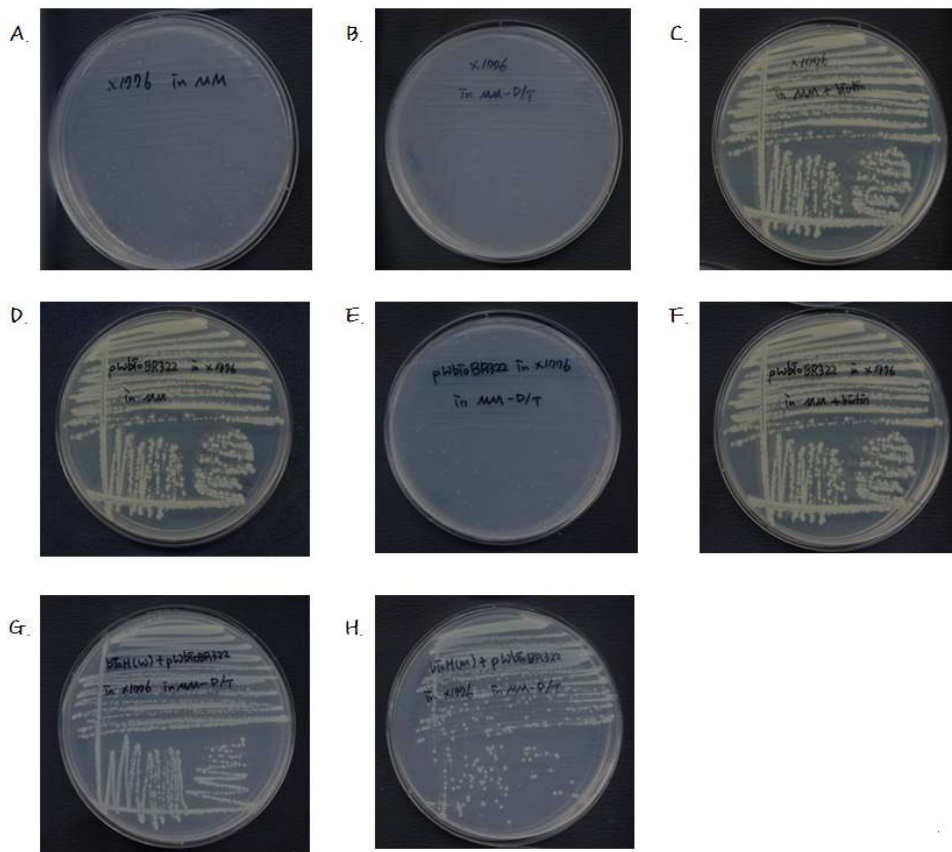


Figure 34. Complementation test *E.coli* x1776 by recombinant plasmids

- A. *E.coli* x1778 in Minimal Media
- B. *E.coli* x1776 in Minimal Media-D/T
- C. *E.coli* x1776 in Minimal Media+Biotin
- D. *E.coli* x1776 containing pWbioBR322 in Minimal Media
- E. *E.coli* x1776 containing pWbioBR322 in Minimal Media-D/T
- F. *E.coli* x1776 containing pWbioBR322 in Minimal Media+Biotin
- G. *E.coli* x1776 containing pWbioBR322+bioHW in Minimal Media-D/T
- H. *E.coli* x1776 containing pWbioBR322+bioHM in Minimal Media-D/T

(나) *bioH* copy 증대에 따른 발현 증가가 biotin 생성에 미치는 영향

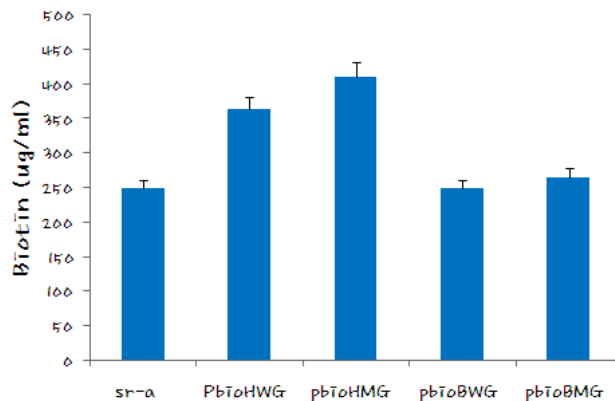
pbioHWG와 pbioHMG를 biotin 고생산 균주인 바이오옴엔디에서 제공한 돌연변이 주인 *S.marcescens* MDBM1 (sr-MDB)에 형질전환하고 발현을 유도하여 biotin 생성량을 bio-assay와 HPLC를 통해 정량하였다. 그 결과 *bioH*를 self promoter 하에서 발현 시켰을 때가 *bioB*를 self promoter하에 발현시켰을 때보다 biotin 생성량이 60%



이상 증가하였다(Table 9, Figure 35). 이는 biotin 생성량에 *bioB* 유전자보다 *bioH* 유전자가 더 영향을 미친다고 보여진다.

**Table 9.** D-biotin production by recombinant *S.marcescens* MDBM1 containing several plasmids

	Growth (OD600nm)	Biotin (ug/ml)	Relative conc.(%)
sr-a	19.89	249.3	100
p <i>bio</i> HWG	19.95	362.9	146
p <i>bio</i> HMG	16.86	411.2	165
p <i>bio</i> BWG	15.84	248.6	99.7
p <i>bio</i> BMG	19.98	264.6	106



**Figure 35.** D-Biotin production by mutant *Smarcescens* MDBM1 harboring p*bio*HG and p*bio*BG. Biotin concentrations are the mean value of 3 times separate experiments

이러한 결과를 바탕으로 *bioH* 유전자 도입에 의한 recombinant plasmid의 안정성과 biotin 생성량에 대해 연구해보고자 하였다.

**(다) *bioH*가 도입된 recombinant plasmid 안정성 향상 및 이것이 biotin 생성에 미치는 영향**

앞서 제작된 recombinant vector인 pJ*EYR*, pJ*MEYR*, pJ*MEYR*-R, pJ*EYR*-R (have full biotin operon, *bioB* gene under the PL promoter, and *par* locus, constructed in this lab) 에 *bioH* 유전자를 도입한 recombinant vector를 제작하여 biotin 생성량을 높이고자 하였다. 우선 pJ*EYR*을 포함한 recombinant vector들의 *NheI* site로 *bioH*

를 삽입시켰다(Figure 36). PL promoter 하에서 wild type *bioB* 가 발현되고 wild type biotin operon 과 *par* locus를 포함하고 self promoter 하에서 wild type *bioH*가 발현되는 plasmid를 p*bioHW*\_JEYR로 명명하였고, 여기에 mutant *bioH* 를 포함한 경우 p*bioHM*\_JEYR이라고 명명하였다. PL promoter 하에서 mutant type *bioB* 가 발현되고 wild type biotin full operon 과 *par* locus를 포함하고 self promoter 하에서 wild type *bioH*가 발현되는 plasmid를 p*bioHW*\_JMEYR, 여기에 mutant *bioH* 를 포함한 경우 p*bioHM*\_JMEYR이라고 명명하였다. 또한 PL promoter 하에서 wild type *bioB* 가 발현되고 mutant type biotin operon 과 *par* locus를 포함하고 self promoter 하에서 wild type *bioH*가 발현되는 plasmid를 p*bioHW*\_JMEYR-R로 명명하였고, 여기에 mutant *bioH* 를 포함한 경우 p*bioHM*\_JMEYR-R이라고 명명하였다. PL promoter 하에서 mutant type *bioB* 가 발현되고 mutant biotin full operon 과 *par* locus를 포함하고 self promoter 하에서 wild type *bioH*가 발현되는 plasmid를 p*bioHW*\_JEYR-R, 여기에 mutant *bioH* 를 포함한 경우 p*bioHM*\_JEYR-R이라고 명명하였다.

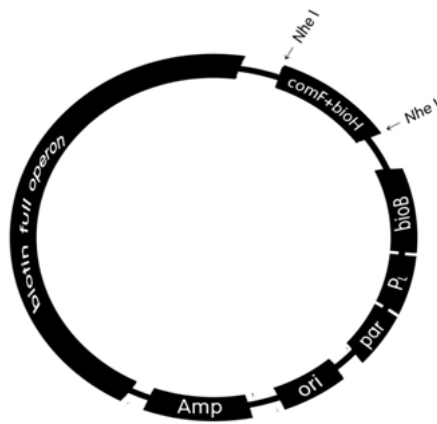


Figure 36. Structure of recombinant p*bioH*\_JEYR

이들 recombinant plasmid를 *S.marcescens* MDBM1에 형질 도입 시킨 후 배양하여 relative plasmid stability(%)를 조사하였고, HPLC를 이용하여 biotin 생성량을 관찰하였다.

**Table 10.** Plasmid stabilities of recombinant strains

Growth&Stabilities		Growth(hr) (OD600nm) <sup>a</sup>		Relative plasmid stability (%) <sup>b</sup>	
Strain	Time	48	120	36	120
MDBM1		18	17	NT <sup>c</sup>	NT
pbioHW_JEYR		16	13	72	1.35
pbioHM_JEYR		17	12	61	0.68
pbioHW_JMEYR		17	21	95	60
pbioHM_JMEYR		18	18	93	93
pbioHW_JMEYR-R		15	20	81	86
pbioHM_JMEYR-R		19	19	77	66
pbioHW_JEYR-R		18	21	94	83
pbioHM_JEYR-R		17	18	95	82

**Table 11.** D-Biotin production and plasmid stabilities of recombinant strains

	Growth (OD600nm) <sup>d</sup>	Biotin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Relative conc(%)	Plasmid stabilities (%) <sup>b</sup>
MDBM1	17	481	100	NT <sup>c</sup>
pbioHW_JEYR	12	445	93	66
pbioHM_JEYR	14	436	91	81
pbioHW_JMEYR	15	348	72	74
pbioHM_JMEYR	13	506	105	59
pbioHW_JMEYR-R	14	397	83	88
pbioHM_JMEYR-R	13	527	110	51
pbioHW_JEYR-R	15	291	61	87
pbioHM_JEYR-R	17	431	90	79

a. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30 °C with shaking at 200rpm. At each time point cells were collected and measured OD at 600nm.

b. Same number of cells were plated simultaneously on the LB agar medium with and without Ap. The ratio between the number of colonies appeared in the agar medium with and without Ap was defined as the relative plasmid stability.

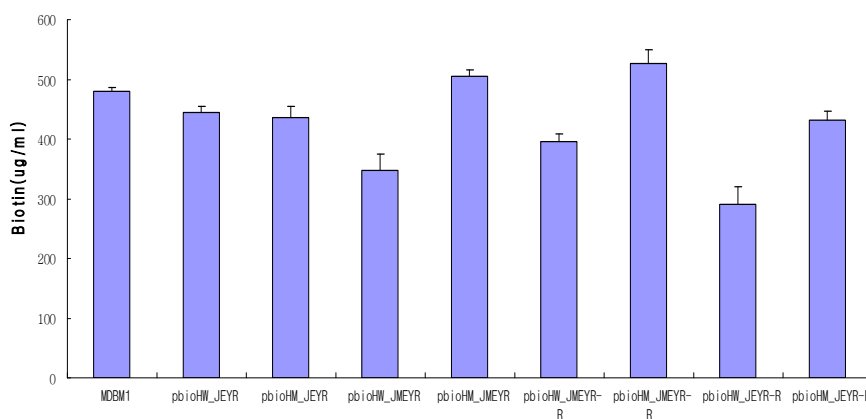
$$\text{Relative plasmid stability(\%)} = \frac{\# \text{ of colonies with presence of Ap}}{\# \text{ of colonies without Ap}} \times 100$$

c. NT, not tested.

d. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30°C which shaking at 200rpm for 144hr.

Biotin 생성량을 보면 pbioHM\_JMEYR-R을 포함하는 균주에서 527 $\mu\text{g/ml}$ 의 biotin 생성량을 나타내었는데(Table 10, Figure 37), 이 plasmid 는 PL promoter 하에 wild

type *bioB* 가 과잉 발현되고 mutant type biotin full operon 와 Self promoter 하에 mutant type *bioH* 를 가지고 있으며 이를 biotin 고 생산 돌연변이 균주인 *S. marcescens* MDBM1 균주에 형질 도입하여 배양한 것이다. 앞선 *bioH* 유전자와 *bioB* 유전자의 biotin 생성량에 미치는 영향과 위의 결과를 통해 우리는 *bioH* 유전자의 과발현과 biotin operon의 발현량 사이에 상관 관계가 있다는 것을 알 수 있었다. *bioH* 유전자가 정상적인 수준의 biotin operon의 발현 하에 과발현되었을 때는 biotin 생성량을 65% 정도 증가시키지만, 바로 위의 결과처럼 biotin operon이 과잉 발현 하에 *bioH* 유전자가 과 발현 되면 오히려 biotin 생성량을 감소시킨다는 사실을 확인하였다. 이는 plasmid stability(%)가 다른 균주에 비해 감소한 p*bioHM\_JMEYR-R*을 포함하는 균주에서 biotin 생성량이 증가한다는 것을 통해 알 수 있다.



**Figure 37.** D-Biotin production by mutant *S.marcescens* MDBM1 harboring recombinant plasmids. Biotin concentrations are the mean value of 3 times separate experiments

#### 아) 항생제 첨가 및 지속적인 고생산 재조합 균주의 선별에 따른 plasmid stability 향상과 biotin 생성량의 증가

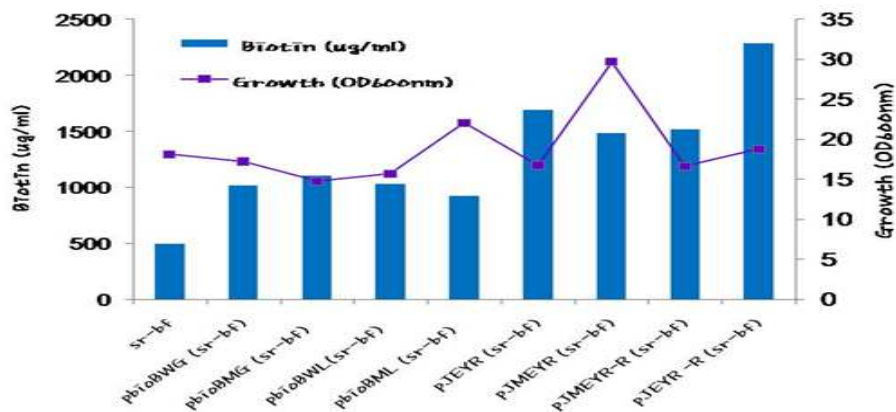
앞선 연구에 따라 처음 seed culture 로부터 production media에 배양액을 transfer 할 시점과 배양 중 plasmid stability가 급격히 떨어지는 시점인 48시간째에 각각 ampicillin을 첨가하면 이에 따라 plasmid stability가 높아져 biotin 생성량의 증가를 가져온다는 것을 확인하였다. 그래서 처음 seed culture 로부터 production media에 배양액을 transfer할 시점과 배양 중 plasmid stability가 급격히 떨어지는 시점인 48 시간째 모두에 ampicillin을 첨가하면 그에 따라 plasmid stability가 높아져서 biotin 생성량의 증가를 생각되어 이 균주들에 항생제 첨가 및 지속적인 고생산 재조합 균주의 선별을 통해 배양하여 biotin 생성량을 HPLC를 통해 관찰한 결과 p*JEYR-R* 을

포함하는 균주에서 1700~2300  $\mu\text{g/ml}$  의 가장 높은 biotin 생성량을 나타내었다 (Table12, Figure 38).

**Table 12.** Plasmid stabilities of recombinant strains after addition of ampicillin to the culture media

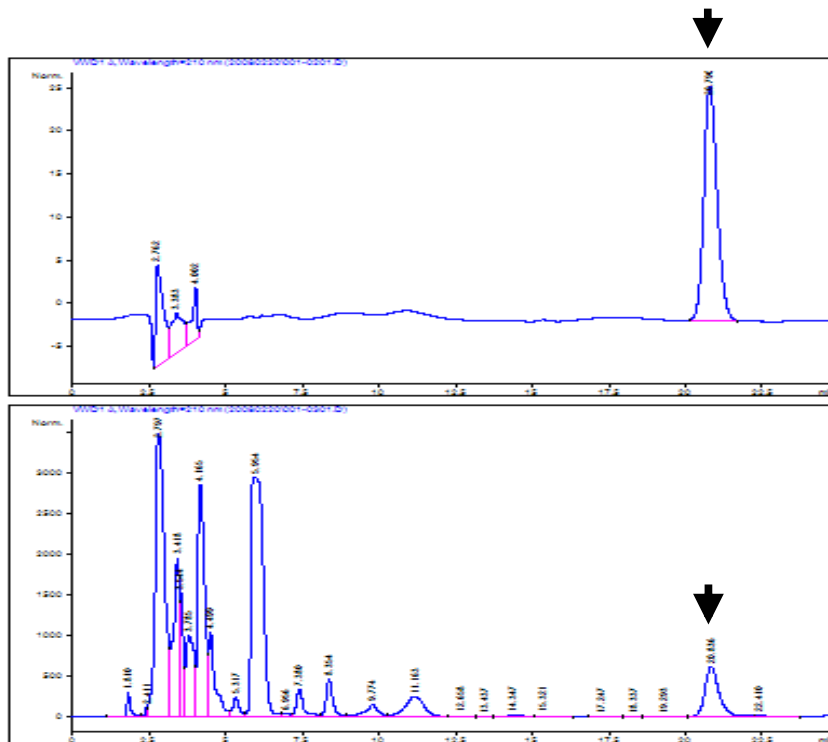
	Growth (OD600nm) <sup>a</sup>	Plasmid stabilities (%)
sr-bf	18.12	NT
pbioBWG	17.23	0
pbioBMG	14.79	0
pbioBWL	15.72	0
pbioBML	22.05	0
pJEYR	16.77	96.9
pJMEYR	29.68	16.1
pJMEYR-R	16.65	82.9
pJEYR-R	18.78	96.1

a. Cells were grown in a 250 ml-Erlenmeyer flask containing 50 ml of production medium at 30°C with shaking at 200rpm for 144hr. Cells were inoculated and cultured at 30°C. At each time point cells were collected and measured OD at 600nm



**Figure 38.** D-Biotin production of recombinant strains harboring recombinant plasmid after addition of ampicillin to the culture media

Figure 39은 HPLC 에 의한 biotin 분석 자료이다.



**Figure 39.** HPLC analysis of biotin production of recombinant *S. marcescens*-bf harboring pJEYR. Upper panel shows the standard (100 $\mu$ g/ml) biotin and bottom panel shows the culture broth. The concentration scale is different between standard and sample. The same retention time is shown in the figure as shown by arrows.

## 2. 배지 및 발효공정 최적화 실험

### 1) 삼각 flask 실험: 1차년도 실험 결과

#### 가) 사용균주 및 배지

-사용균주: MDBM1-14

-1차 seed 배지: 조제 pH(7.5), 살균 후 pH(6.8)

Bato Peptone 1%

Yeast extract 1%

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%

Glucose 0.2%

소포제 0.05%

배양온도: 30 °C, RPM: 220

-기본 Main 배지: 조제 pH(7.0), 살균 후 pH(7.8)

Urea 1.0%

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2% (별도 살균 후 첨가)

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.02%

탄소원 5.0% (별도 살균 후 첨가)

#### 나) 1차 seed 최적화 실험

-1차 seed 최적화를 위하여 시간별 pH 및 O.D 값을 측정함

-1차 seed 최적점을 pH 6.2-6.3, O.D 값이 0.5-1.2 사이를 1차 seed 최적값으로 선정 함

표 1. 삼각flask 배양시 1차 seed 성장 곡선 및 pH 변화

배양시간	pH	O.D
0	6.90	0.08
3	6.82	0.10
5	6.56	0.45
7	6.23	0.86
9	6.29	1.21
10	6.35	1.40

#### 다) 탄소원 영향 실험

- 최적의 탄소원을 선별하기 위하여 기본 main 배지의 탄소원으로 glucose, sucrose, 저당을 이용하여 최적의 탄소원을 선정하는 실험을 실시 함. Sucrose가 기본배지에서 사용한 glucose보다 비오틴 생산에 유리한 것으로 밝혀짐
- 사용한 당의 농도: 5%
- 배양시간: 4일

표 2. 탄소원 비교실험 결과

	Glucose	Sucrose	저당
pH	6.4	6.6	6.2
O.D	22.5	24.5	25.5
Biotin 농도(g/L)	0.6	0.7	0.65

#### 라) 질소원 영향 실험

- 기본배지의 질소원이 부족한 것으로 판단되어 질소원 보강실험을 실시 함. 질소원으로 는 상업적 대량 발효에 사용되는 저가의 질소원인 CSL, Tuna extract 및 대두박을 첨가하는 실험을 실시하였다.
- 탄소원으로는 sucrose 5%를 사용함.
- 배양시간: 4일

표 3. 질소원 보강 실험 결과

	CSL 0.5%	Tuna extract 0.5%	대두박 0.5%
pH	6.7	6.5	6.8
O.D	24	25.5	측정불가
Biotin 농도(g/L)	0.8	0.55	0.65

## 2) 5L 발효조 실험: 1차년도 실험 결과

### 가) 2차 seed 성장 곡선 확립 실험

- 삼각 flask를 이용하여 배양한 1차 seed 배양액 1%를 5L 발효조를 이용한 2차 seed 배양을 위하여 사용하였다.
- 1차 seed 배양에 비하여 배양시간은 2시간 정도 단축되었으며, 동일한 배지를 사용한 결과 비슷한 pH 변화와 O.D의 변화를 관찰할 수 있었다.



-2차 seed의 최적 pH 및 O.D 값으로 1차 seed의 결과와 유사한 pH 6.2-6.5, O.D 값은 0.5-1.2 사이를 2차 seed 최적값으로 선정 함

표 4. 5L 발효조를 이용한 2차 seed 성장 곡선 및 pH 변화

배양시간	pH	O.D
0	6.94	0.08
2	6.89	
3	6.80	0.14
4	6.72	
5	6.53	0.68
6	6.38	
7	6.11	1.26
8	6.12	1.54
9	6.29	1.74
10	6.41	

#### 나) 당농도 최적화 실험

-탄소원으로 사용하는 Sucrose 농도를 5%, 7%, 10%를 이용하여 초기 당농도가 biotin 생성에 미치는 영향을 조사 함. 당농도를 10%까지 사용한 경우 균체의 성장 및 생선된 biotin의 농도가 가장 높은 것으로 판명되었다. 하지만 사용당에 비하여 biotin 농도가 아주 높은 것으로 판단되지 않기에 향후 당을 효과적으로 공급할 수 있는 방법을 추가적으로 확인하여야 할 것으로 판단 됨.

-배양시간: 5일

표 5. 5L 발효조를 이용한 당농도 최적화 실험 결과

	5%	7%	10%
Final O.D	26.4	38.5	52.7
Final biotin 농도	0.75 g/L	0.85 g/L	1.0 g/L

### 3) 발효조를 이용한 균주별 Biotin 생산성 확인실험

- 발효조: 5L 발효조
- 배양온도: 28 °C
- D.O 조건: 최소한 20% 이상 D.O 조건을 유지 함.
- 초기 RPM: 500에서 D.O 조건을 맞추기 위하여 800까지 순차적으로 상승
- Aeration: 배양초기 0.5vvm에서 24시간 이후 1.0vvm으로 상승
- pH control: 암모니아수를 이용하여 pH. 7.2에서 자동 제어 함
- seed 접종량: 5%

표 6. 5L 발효조를 이용한 배양 결과

배양시간	pH	O.D	당농도(%)	D.O(%)	Biotin(g/L)
0	6.9	1.03	10.4	100	—
14	7.23	1.0	9.4	76	—
20	7.92	2.4	9.2	80	—
38	8.1	3.8	9.0	78.3	0.05
44	7.28	4.6	8.8	70	0.15
62	7.38	7.2	8.3	45	0.35
91.5	7.12	23.0	5.7	30	0.75
120	7.29	52.7	0.2	35	1.0

#### 4) 균주개발: 2차년도 실험 결과

##### 가) 바이오옴에디(주관)와 한국의국어대학 이현환 교수팀(위탁연구기관) 개발 균주 목록

균주명	개발방법	유전적 특징	Flask 농도* (5L 발효조)	개발 주체
<i>S. marcescens</i> 8000		wild type	0.08 g/L	-
MDB-a	UV 돌연변이	Acidomycin 내성	0.6 g/L (1.0 g/L)	주관
MDBM1	UV 돌연변이	MDB-a균을 Host로 사용 함	0.9 g/L (1.55 g/L)	주관
MDB-a-pbioBWG	유전자재조합	Host: MDB-a wild균의 bioB gene 도입	1.05 g/L (1.85 g/L)	위탁
MDB-a-pbioBMG	유전자재조합	Host: MDB-a MDB균의 bioB gene 도입	1.00 g/L (1.80 g/)	위탁
MDBM1-pbioBWG	유전자재조합	Host: MDBM1 wild균의 bioB gene 도입	1.15 g/L	위탁
MDBM1-pbioBMG	유전자재조합	Host: MDBM1 MDB균의 bioB gene 도입	1.10 g/L	위탁
MDBM1-pbioBWL	유전자재조합	Host: MDBM1-pbioBWG Promoter: pL 교체	1.35 g/L (2.25 g/L)	위탁
MDBM1-pbioBML	유전자재조합	Host: MDBM1-pbioBMG Promoter: pL 교체	1.45 g/L (2.45 g/L)	위탁
<b>MDBM1-pJEYR</b>	<b>유전자재조합</b>	<b>Host: MDBM1-pbioBWL</b> <b>wild type biotin operon</b> <b>par locus gene 도입</b>	<b>1.95 g/L</b> <b>(2.85 g/L)</b>	위탁
MDBM1-pJMEYR-R	유전자재조합	Host: MDBM1-pbioBWL MDB type biotin operon par locus gene 도입	1.50 g/L (2.35 g/L)	위탁
MDBM2 (MDBM1-u-27)	UV 돌연변이	MDBM1을 Host로 사용함	1.50 g/L (2.60 g/L)	주관

\* Flask : 3 Flask 이상 평균

**나) 위탁연구 기관에서 개발한 유전자변형 균주(MDBM1-pbioBWL, MDBM1-pbioBML)를 이용한 5L 발효조 역가 확인 실험**

당사가 U.V 돌연변이를 이용하여 1차로 개발한 MDB-a 균주를 host로 사용하여 개발한 MDB-a-pbioBWG, MDB-a-pbioBMG 균주를 5L 발효조(Fig. 1, 2)이용하여 biotin 생산 능력을 검증하였다. Table 5.에서와 같이 모균주 MDB-a(1.0 g/L) 와 비교하여 MDB-a-pbioBWG(1.85 g/L)와 MDB-a-pbioBMG(1.80 g/L) 유전자재조합 균주가 biotin 생산능력이 크게 향상됨을 알게 되었다. 배양 말기에는 Fig. 2에서와 같이 *S. marcescens* 균주의특징인 분홍빛 색깔이 균주에 따라서 관측되었다.

Table 1. 5L 발효조를 이용한 MDB-a 균주와 MDB-a-pbioBWG, MDB-a-pbioBMG 균주의 biotin 생산성 비교 실험

	MDB-a	MDB-a-pbioBWG	MDB-a-pbioBMG
배양시간	57 시간	57 시간	57 시간
final pH	7.65	7.24	7.45
O.D	127	95	102
Biotin 농도(g/L)	1.00 g/L	1.85 g/L	1.80 g/L

**다) 바이오옴엔디 균주개발 현황**

1차년도 과제를 통하여 개발한 MDBM1 균주를 이용하여 자외선을 이용한 돌연변이를 실시함. 이때 자외선 조사시간은 치사율 99.9% 이상이 되는 50초를 실시함. 돌연변이 100균주를 선별하여 main 배지 및 삼각 flask를 이용하여 우수균주 후보인 MDBM1-u-27 균주를 선별함. 선별된 MDBM1-u-27 균주를 1 차 순수분리 작업을 실시하여 MDBM1-u-27-9 균주를 선별함. MDBM1-u-27-9 균주의 형질 안정화를 위하여 일회 더 순수분리 작업을 실시하여 MDBM1-u-27-9-9번 균주를 선별하여 최종 우수균주로 선정 함. MDBM1-u-27-9-9를 MDBM2 균주로 명명하여 발효조를 이용하여 MDBM1과 MDBM2 균주의 최종 역가를 확인함. MDBM2 균주(O.D=116, 60시간)는 기존의 MDBM1 균주(O.D=121, 60시간)에 비하여 growth는 조금 느린 것으로 관측되었지만 biotin 생성 능력은 50% (MDBM2=2.54 g/L, MDBM1=1.62 g/L)이상 향상된 것으로 판단 됨(Table 2). 당사는 3차년 연구 개발 기간동안 MDBM2 균주를 위탁기관인 한국외국어대학에 제공하여 새로운 host로 사용하여 현재까지 개발된 새로운 안정된 plasmid를 도입하여 biotin 생산성을 다시 한번 향상시킬 계획 임.

Fig. 1. 5L 발효조 start 사진



Fig. 2. 5L 발효조 배양 종료 시점 사진



Table 2. 5L 발효조를 이용한 MDBM1균주와 MDBM2 균주의 biotin 생산성 비교 실험

	MDBM1	MDBM2
배양시간	60 시간	60 시간
final pH	7.82	7.69
O.D	121	116
Biotin 농도(g/L)	1.62 g/L	2.54 g/L

**라) 위탁연구기관에서 2차로 개발한 유전자변형 균주(MDBM1-pbioBWL, MDBM1-pbioBML)를 이용한 5L 발효조 역가 확인 실험**

MDBM1 균주를 host로 사용하여 개발된 MDBM1-pbioBWL, MDBM1-pbioBML 유전자재조합 균주의 역가를 5L 발효조를 이용하여 비교 실험을 실시하였다. 새롭게 개발된 MDBM1-pbioBWL, MDBM1-pbioBML 두균주는 promoter 강력한 pL promoter로 교체되어 biotin 생산능력은 증가되었지만 균체 성장속도가 낮다는 결과를 위탁연구기관으로부터 전하여 들었다. 하여 두 균주 실험을 위하여 균체 성장에 중요한 영양소 공급인자인 yeast extract 농도를 5 g/L에서 6 g/L로 증가하였으며 매우 저가이면서 영양소가 풍부한 CSL의 농도를 4 g/L에서 6 g/L로 증가하였다. Table 3에서와 같이 유전자재조합 균주인 MDBM1-pbioBWL(2.25 g/L), MDBM1-pbioBML(2.45 g/L)는 host인 MDM1 균주(1.62 g/L) 보다 50% 이상 biotin 생산 능력이 향상된 결과를 나타내었다.

Table 3. 5L 발효조를 이용한 MDBM1균주와 MDBM1-pbioBWL, MDBM1-pbioBML 균주의 biotin 생산성 비교 실험

	MDBM1	MDBM1-pbioBWL	MDBM1-pbioBML
배양시간	64 시간	64 시간	64 시간
final pH	7.85	7.35	7.45
O.D	125	110	118
Biotin 농도(g/L)	1.55 g/L	2.25 g/L	2.45 g/L

**마) 위탁연구기관에서 3차로 개발한 유전자변형 균주(MDBM1-pJEYR, MDBM1-pJMEYR-R)를 이용한 5L 발효조 역가 확인 실험**

위탁연구기관에서 새로운 유전자재조합 균주의 개발 과정에 가장 큰 문제점으로 나타난 plasmid 안정성을 향상하기 위하여 par locus 유전자를 도입한 새로운 균주를 개발하였다(바이

오엠엔디에서는 plasmid 안전성을 체크하지 않음). 새롭게 개발한 균주 전체 4가지 종류였으나 당사는 위탁연구기관의 flask 실험결과 및 연구자들의 제안으로 host를 MDBM1-pbioBWL를 사용한 MDBM1-pJEYR, MDBM1-pJMEYR-R 균주를 이용하여 5L 발효조 실험을 실시하였다. MDBM1-pbioBWL, MDBM1-pbioBML 균주 배양시 사용한 동일한 발효배지를 이용하여 5L 발효조에서 두 균주의 biotin 생산능력을 확인하였다. Table 4.에서와 같이 MDBM1-pJEYR(2.80 g/L) 균주는 지금까지 개발된 균주 가운데서 가장 높은 biotin 생산능력을 보여주었다. 이것은 palsmid의 안정성이 증가한 결과로 판단된다.

Table 4. 5L 발효조를 이용한 MDBM1균주와 MDBM1-pJEYR, MDBM1-pJMEYR-R 균주의 biotin 생산성 비교 실험

	MDBM1-pbioBML	MDBM1-pJEYR	MDBM1-pJMEYR-R
배양시간	62 시간	62 시간	62 시간
final pH	7.40	7.42	7.55
O.D	116	112	110
Biotin 농도(g/L)	2.40 g/L	2.80 g/L	2.35 g/L

**바) biotin 전구 물질 첨가가 biotin 생산성에 미치는 영향 실험.**

지금까지 개발된 가장 우수한 균주로 확인된 MDBM1-pJEYR 균주를 이용하여 biotin 전구 물질인 dethiobiotin을 첨가가 biotin 생산성에 미치는 영향을 실험하였다. detiobiotin 첨가시 약간의 biotin 생산성 증가가 관찰되었다(table 5, 6, 7). 고가의 detiobiotin을 사용하였지만 예상보다 생산성이 낮기 때문에 원가만 상승시키는 결과를 나타내었다. 하여 향후 배양 실험에서는 biotin 전구물질인 detiobiotin을 사용하지 않기를 결정하였다.

Table 5. biotin 전구물질 첨가가 biotin 생산성에 미치는 영향 실험

	MDBM1-pJEYRL	MDBM1-pJEYRL
Dethiobiotin	첨가	첨가하지 않음
배양시간	58 시간	58 시간
final pH	7.8	7.79
O.D	110	115
Biotin 농도(g/L)	2.70 g/L	2.65 g/L

Table 6. biotin 전구물질 첨가가 biotin 생산성에 미치는 영향 실험

50A 3 (5L - JAR) 2007. 01.09 ~ 2007. 01.11

시간	Age	PH	OD (600nm)	R S(%)	Temp ( $^{\circ}$ C)	Air (VVM)	rpm	DO	역가 (mg/L)
9/ 오피오	0	7.64	2.04	5.8	30	0.5	500	100	
14		7.36					700	16.2	
15	6	7.34 / 7.00	1.87 x 100		30.1	0.5	500	13.0	
16						0	400		
17 오피오	24	7.93 / 7.66	42.9	1.0	30.0	0.5	500		2.8 mg RE
15	30	7.94 / 7.66	115		30.1	0.5	500	56.7	10.50 mg seed 1.75 mg
18 오피오	48	7.93 / 7.62	116	1.5	30.1	0.5	500	12.1	2.98
20 오피오	54	7.91 / 7.44		1.5	30.0	0.5	500	41.4	2.85
오피오	58	7.8	110	1.1	30	0.5	500	48.6	2.90

\* d-Derthiobiotin 30% BL PH 7.75  
 † Seed = final PH: 6.44 OD: 5.83



Table 7. biotin 전구물질 첨가 하지 않음에 biotin 생산성에 미치는 영향 실험

JAR# (5L-JAR) 2007. 01. 09 ~  
2007. 01. 11

time	date	OD	OD	$\mu$	temp	air	rpm	DO	g/L (g/L)
			(600nm)	S(%)	( $^{\circ}$ C)	(VVM)			
09:00	0	7.56	2.0	9.6	30	0.5	700	1.00	
14:00		7.36					700	1.08	
15:00	6	$\frac{2.30}{0.11}$	$\frac{0.167 \times 1000}{1000}$		30		800	25.2	
16:00							900		
I/ 09:00	24	$\frac{8.30}{0.62}$	$\frac{88.7}{1000}$	1.0	30	0.5	900		$\frac{1.59}{0.99}$
15:00	30	$\frac{9.34}{0.69}$	$\frac{112}{1000}$		30.1	0.5	900	72.1	1.59
II/ 09:00	48	$\frac{1.40}{0.50}$	117	1.0	30	0.5	900	50.2	2.65
15:00	54	$\frac{1.60}{0.59}$		1.0	30.1	0.5	900	$\frac{47.8}{16}$	2.80
19:00	60	1.08	115	0.7	30	0.5	900	52.1	2.65
X seed: final p <sub>11</sub> = 6.44 <span style="float:right">OL p<sub>11</sub> 8.63 OP 2 9.83</span>									

사) 당 feeding이 생산성에 미치는 영향 실험.

탄소원인 설탕의 농도가 균체의 성장 및 생산성에 미치는 영향을 실험하기 위하여 배양 초기 농도 및 중간에 첨가하는 당의 농도를 변화시켜 균체의 성장 및 생산성에 미치는 영향을 실험하였다. Table 7에서와 같이 초기 당 농도를 10%에서 3%로 낮추고 당 농도가 0.5% 이하에 다다르면 다시 3%의 당을 추가하였다. 이 같은 방식으로 당의 농도를 낮게 유지시켰을 때 균체의 성장은 초기당을 10%를 사용한 control과 비교하여 매우 낮았지만 생산된 비오틴의 양은 급격하게 증가하여 4.85g/L를 기록하였다. 동시에 배양시간은 60 시간에서 80시간으로 20시간 정도 연장되었다.

Table 8. 당의 농도가 균체의 성장 및 생산성에 미치는 영향

	초기당 10%	초기당 3% 및 feeding
당 농도	초기 10%, 일회 feeding 2% (전체 사용 당 12%)	초기 3%, 0.5% 이하에서 3% feeding, (전체 사용 당: 18%)
배양시간	60 시간	80 시간
final pH	7.85	7.79
O.D	120	75
Biotin 농도(g/L)	2.78 g/L	4.85 g/L

**아) 50L 발효조를 이용한 pilot scale 배양실험.**

MDBM1-pJEYR 균주를 이용하여 당사가 보유하고 있는 50L 발효조(Fig. 3)를 이용하여 배양 실험을 실시하였다. 50L 발효조를 이용한 실험을 통하여 scale-up에 필요한 데이터와 향후 시제품 생산을 위한 정제용 샘플을 공급하는 것을 목적으로 실험을 실시하였다. Table 9에서와 같이 초기 당농도를 10%로 하고 2%의 추가당을 공급한 결과 50L 발효조에서도 5L 발효조와 유사한 실험결과를 나타내었다. 오히려 통기효과 및 교반효과가 우수하여 5L에 비하여 biotin 생산성은 2.85 g/L로 5L 발효조에 비하여 높게 나타났다. 초기당을 3%로 한후 배양액의 당농도를 측정하여 당농도가 0.5% 이하에서 추가당을 3%씩 5회에 걸쳐서 공급하였다(Table 10). 과도한 균체의 성장이 제어되면서 5L와 유사한 4.66 g/L의 높은 비오틴이 생산되는 결과를 얻을 수 있었다.

Fig. 3. 50L 발효조



Table 9. 50L 발효조를 이용한 pilot scale 배양 실험 결과(초기당 10%, feeding 2%)

50L 발효

2007. 01.15 ~ 01.17

시간	Age	PH	OD (600nm)	R S(%)	Temp (℃)	Air (VVM)	rpm	DO	역가 (g/l)
15/10:00	0	7.48	1.8	10.1	30	0.5	200	100	
15:00	5	7.25			30				
18:00	8	7.11	0.18 x 100		30	0.5	220	21.0	
16/09:00	23	7.07 / 7.52	86.5	1.0	30	0.5	240	140	0.74
16:00	30	7.04 / 7.31	110	1.2	30	0.5	260	200	1.66
23:00	37	7.05 / 7.58	118	1.0	30	0.7	280	140	
17/08:00	46	7.00 / 7.54	125	0.9	30	0.7	280	9.2	2.62
14:00	52	7.05 / 7.82	122	1.5	30	0.8	280	11.5	2.85
20:00	58	7.65	118	0.7	30	0.8	280	49.6	2.85
* d - deth:obiotin 추가하지 않음 * seed: final pH: 6.38 OD: 10.2									

Table 10. 50L 발효조를 이용한 pilot scale 배양 실험 결과(초기 3%, 0.5% 이하에서 3% feeding.)

배양시간	pH	O.D	당농도(%)	D.O(%)	Biotin(g/L)
0	6.9	1.03	3.2	100	-
12	7.23	22.0	0.6(3.0 feeding)	5	-
22	7.11	70.4	0.5(3.0 feeding)	15	0.65
34	7.35	72.5	0.4(3.0 feeding)	26	1.85
48	7.28	70	0.6(3.0 feeding)	25	2.86
68	7.38	68.5	0.5(3.0 feeding)	35	3.69
70	7.12	66.5	1.5	85	4.35
84	7.58	68.5	0.2	95	4.66

### 3. 정제공정 개발

#### 1) 정제공정의 구성

##### 가. 세포제거 및 흡착 수지탑 공정

5L 발효조를 이용한 개발단계에서는 배양이 종료되면 우선 세포를 제거하기 위하여 원심분리 방법이나 MF (Microfiltration) 제균 여과 공정을 사용하였으나, 50L 발효조를 이용한 스케일-업 단계에서는 생산원가를 줄이기 위하여 균체분리와 배양액내의 Biotin 흡착 공정을 동시에 수행할 수 있는 공정을 개발하였다.

사용한 다공성 흡착수지인 SP 850 수지는 Binding capacity의 테스트 결과 수지 1L 당 약 4리터의 배양액을 로딩할 수 있었으므로, 50L 발효조를 이용한 배양액(액량 30L)의 처리를 위하여 수지 8L를 수지탑에 패킹하여 사용하였다.

배양액 30리터를 수지탑에 붓고 1시간 동안 교반시킨 후에 약 5분간 정치시켜 수지를 가라앉히고, 상등액을 수지탑에 장착된 밸브를 열고 배수시켰다. 그런 후에 수지를 5mM 염산용액으로 세척한 후에 0.1N 암모니아수(10% 메탄올)를 이용하여 Biotin을 용출시켰다.

SP850 수지 공정을 통해 얻어진 용출액의 부피는 약 25리터 정도이며, Biotin의 함량은 61g(단위수율 84 %)이었다.



- a. 발효조로부터 배양액 회수
- b. 황산용액을 이용하여 pH5로 조정
- c. SP850 수지탑에 배양액 로딩후 1시간 교반
- d. 5분간 정치 후 상등액을 밸브 통해 배수
- e. 5mM 염산용액으로 수지 세척
- f. 0.1N 암모니아수(10% 메탄올)로 Biotin 용출
- g. 1N NaOH로 수지 재생

## 나. 음이온 교환수지 크로마토그래피 공정

흡착 수지 크로마토그래피 공정을 통해 얻어진 용출액을 Rota-Evaporater를 이용하여 감압 농축하였다. 이때 농축은 용출액에 포함된 메탄올 및 암모니아를 증발시키기 위한 목적이므로 잔존비율을 80%(농축된 시료 부피는 약 20L) 정도로 수행하였다.

농축이 완료되면 황산용액을 첨가하여 pH를 7.0으로 조정한 후에 강염기성 음이온 교환수지에 흡착시켰다. 이때 사용한 수지는 DIAION PA312 이며, 1.5L 부피의 수지를 직경 15cm 의 Glass column에 패킹하여 수행하였다.

100ml/min의 유속으로 시료의 로딩이 완료되면 수지를 세정수로 1차 세척하였으며, 컬러 물질들을 제거하기 위하여 2% Sodium bicarbonate 용액을 2CV(3L) 정도 흘려 2차 세척한 후에, 0.2N 암모니아수를 이용하여 Biotin을 용출시켰다. 이때 얻어진 용출액의 부피는 약 8리터 정도이며, Biotin의 함량은 55g(단위수율 90 %)이었다.

시료에서 컬러 물질들을 제거하기 위한 탈색 공정을 위해 처음에는 HP20 흡착 수지 크로마토그래피의 추가 적용을 검토하여 실험하였으나, 음이온 교환수지 단계에서 2% Sodium bicarbonate 용액을 사용한 2차 세척 공정을 사용함으로써 공정을 단순화하였다.

- a. 흡착수지 용출액의 감압 농축(잔존비율 80%)
- b. 황산용액을 첨가하여 pH7로 조정
- c. DIAION PA312 컬럼에 샘플 로딩
- d. 세정수로 수지 1차 세척
- e. 2% Sodium bicarbonate 용액으로 수지 2차 세척
- f. 0.2N 암모니아수로 Biotin 용출
- g. 1N NaOH로 수지 재생
- h. 세정수로 세척
- i. 1N HCl로 수지 재생
- j. 세정수 세척

#### 다. 2% Biotin 액상제품의 제조

음이온 교환수지 크로마토그래피 공정을 통해 얻어진 용출액을 Rota-Evaporater를 이용하여 감압 농축을 하게 되는데, 가축 사료용 첨가 제품인 2% Biotin 액상 제품의 제조를 위해서는 이후의 결정화 공정을 생략하는 것이 가능하므로 잔존비율을 20% 정도로 수행하였으며, 농축이 완료되면 염산용액을 첨가하여 pH를 7.0으로 조정하였고, HPLC 정량분석 결과에 따라 최종 2% 농도로 희석하였다.

2% 액상제품의 경우에는 단위공정 수율이 거의 100%라는 장점이 있는 동시에 이와 같이 농축공정의 간소화와 비교적 낮은 단위수율 공정인 결정화 공정을 생략할 수 있다는 점에서 매우 유리하며 제조원가를 대폭 낮출 수 있는 장점이 있다.

- a. 음이온교환수지 용출액의 감압 농축(잔존비율 20%)
- b. 염산용액을 첨가하여 pH7로 조정
- c. HPLC 정량분석 결과에 따라 최종 2% 농도로 희석

#### 라. 결정화 공정과 분말제품의 제조

한편, 보다 높은 순도의 분말제품을 제조하기 위하여 감압 농축 공정 후에 결정화 공정을 적용하였다. 음이온 교환수지 크로마토그래피 공정을 통해 얻어진 용출액을 Rota-Evaporater를 이용하여 감압 농축을 하였는데, 이때 농축된 시료의 부피는 이후 결정화 공정의 수율과 밀접한 관계가 있었다. 농축을 많이 진행하면 Biotin의 농도가 증가되므로 결정화가 용이하게 진행되어 결정화 수율이 증가됨을 알 수 있었다. 결정화 공정을 위한 농축단계에서는 잔존비율을 5 - 10% 정도로 수행하도록 하였다.

농축이 완료되면 염산용액을 첨가하여 pH를 2.8로 조정하고, Cold chamber(4 ℃ )로 옮겨 1시간 동안 교반한 후, 4 ℃ 상태로 하룻밤 정치시킴으로써 결정화를 진행하였다.

초기 결정화 동안에 Magnetic stirrer로 교반을 시켰는데 교반과정이 결정화를 가속시키며 수율도 약간 증가되는 것이 확인되었기 때문이다. 초기 1시간만 교반을 시키고 이후에는 교반하지 않고 정치시킨 이유는 교반이 결정화를 가속시키므로 제품의 순도 측면에서는 정치시키는 방법이 유리하다는 생각 때문이었는데, HPLC 분석결과로는 순도의 차이는 별로 나타나지 않는 편이었고, 단지 초기 1시간 동안의 교반만으로도 결정화의 Seeding에 의한 가속화가 충분히 보였기 때문이다.

이외에도, 결정화 공정에는 시료의 부피, Biotin의 농도, 순도, 온도, 시간 등이 영향을 많이 미치는 것으로 확인되었으므로 조건을 일정하게 유지시키는 것이 필요하였



다.

생성된 결정은 미리 준비한 필터세트를 이용하여 회수하였는데, 회수공정은 Cold chamber 내에서 4 °C 상태를 유지한 채 수행하였다. 분리된 결정은 Vacuum Dry Oven을 이용하여 50 °C에서 감압하에 6시간 이상 건조과정을 진행하였다.

결정화 공정의 단위수율은 약 75% 로 높지 않은 편인데 여과 회수공정을 통해 나온 모액은 폐기하지 않고 모아 두었다가 여러 배치분이 모아지면 재정제(음이온 교환수지 크로마토그래피 공정)를 거친 후에 결정화를 하거나 2% 액상 제품으로 제조한다면 생산수율의 향상이 이루어 질 수 있을 것이다.

- a. 음이온교환수지 용출액의 감압 농축(잔존비율 10% 이하)
- b. 염산용액을 첨가하여 pH2.8로 조정
- c. 4 °C로 옮겨 1시간 교반후 하룻밤 정치시켜 결정화를 진행
- d. 필터세트를 이용하여 결정 회수
- e. 6시간 이상 진공건조
- f. 중량측정 후 밀봉하여 냉동보관

## 2) 정제 결과 요약표

Batch No. :

공정명	규격	부피 (L)	Biotin 량 (g)	단위수율 (%)	수율 (%)
배양액	50L 발효조를 이용한 배양액	29	72.5	-	100
흡착수지탑	SP850, 8L	25.5	60.7	83.7	83.7
감압농축	농축잔존비율 80%	20.7	-	-	-
음이온교환 수지	DIAION PA312 , 1.5L	7.8	54.8	90.2	75.5 (2% 액상제품 의 최종수율)
감압농축	잔존비율 20% (2% 액상제품) 잔존비율 5-10% (분말제품)	1.73 0.56	-	-	-
결정화	4 °C, o/n	0.56	40.2	73.4	55.4 (분말제품의 최종수율)

#### 4. 30 KL 상업화 발효조 실험

(주)월드링크의 20KL 발효조를 이용하여 상업화 규모의 비오틴 발효를 실시 함. 30L 발효조와 2KL 발효조를 이용하여 1단 및 2단 seed를 배양 함. 30KL main 발효 시 초기당은 3%로 하였으며 3시간 간격으로 당을 분석하여 당의 농도가 0.5% 이하 시 600 KG의 설탕을 첨가하여 당 첨가 후 배양액의 당의 농도가 2.5-3.0%에 도달하도록 추가당을 공급 함. 이때 총 사용한 당은 4,000 KG의 당을 사용하여 배양액 기준으로 약 20%의 당을 공급 함. Table 11에서와 같이 main 발효시간은 90 시간을 배양 하였으며 이때 생산된 비오틴은 3.85 g/L로서 5L 또는 50L의 발효조에 비하여 낮은 수준이지만 조건이 아직 확립되지 않은 대용량 발효조를 이용하여 1회 수행한 실험으로는 좋은 결과를 얻었다고 판단된다. 향후 기술이 이전되어 대용량 발효조에서 seed, 배양조건등을 새로이 보완하여 확립할 경우 5L 및 50L에서 얻은 4.8g/L 이상의 비오틴 생산성에 도달 할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 11. 20KL 상업화 발효조를 이용한 배양 결과

배양시간	pH	O.D	당농도(%)	Biotin(g/L)
0	6.9	1.03	3.2	-
14	7.16	18.0	0.5(3.0 feeding)	-
26	7.34	66.5	0.6(3.0 feeding)	0.46
36	7.46	68.5	0.4(3.0 feeding)	1.48
50	7.20	72.0	0.3(3.0 feeding)	2.46
64	7.48	66.5	0.4(3.0 feeding)	3.25
76	7.55	62.5	2.2	3.62
90	7.50	60.0	1.4	3.85

전배양(삼각 flask): 배양시간: 10 시간, Final pH: 6.4, O.D: 1.25

1단 seed(30L 발효조): 배양시간: 8시간, Final pH: 6.35, O.D: 1.45

2단 seed(2KL 발효조): 배양시간: 12시간, Final pH: 6.25, O.D: 1.36

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연차별 연구개발 목표와 달성도

1) 2005. 4.25 ~ 2006. 4.24. (1차년도)

가. 목표

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과
<p><b>1차 우수균주 개발</b></p> <p>-유전공학 기법을 이용한 균주 개발 <b>(위탁연구 과제)</b></p> <p>-대사공학적 방법을 이용한 균주 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•biotin 생합성 유전자 분리, 확보 및 cloning 및 동정</li> <li>•발현 기구 및 조건 개발</li>   <li>• 대사공학적 균주 변형               <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mutation 조건 및 방법확립</li> <li>-최적 치사율 결정</li> <li>-Plate 상에서 우수 균주 선별 방법 확립</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•유전자 동정완료</li> <li>•대사경로 분석완료</li> <li>• 불 필 요 유 전 자 knock-out, 필수 유전자 강화</li>   <li>•대사 경로 변형 및 repression, Inhibition 해제</li> <li>•<b>1.5 g/L biotin</b></li> </ul>
<p><b>Lab scale 발효 최적화</b></p> <p>-Flask 배양</p> <p>-5L발효조 배양</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•통계학적 방법을 이용한 배지 최적화: 탄소원 및 질소원</li> <li>•1차 seed 조건 확립</li> <li>•탄소원 및 질소원 최적 농도 조건 선별</li> <li>•Biotin 생산 증가를 위한 배양온도, 교반속도, pH 등의 배양 조건 확립</li> <li>•2차 seed 조건 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•최적 탄소원 및 질소원 선정</li> <li>•<b>biotin 2.0 g/L(5L발효조)</b></li> </ul>
<p><b>정제 공정 개발</b></p> <p>-균체제거 공정</p> <p>-컬럼 공정 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•효율적 균체 제거 공정 확립:Drum filter, Filter press, M/F, 원심분리 등</li> <li>•탈색 및 흡착 공정 확립을 위한 최적 수지 선정: 이온교환수지, 흡착수지, 탈색 수지</li> <li>•탈색, 흡착, 용리 조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•회수율 90% 이상균체 제거 공정완료</li> <li>-탈색수지 선정</li> <li>-흡착수지 선정</li> </ul>

나. 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
-우수균주 개발 Flask 기준: 1.5 g/L	-돌연변이 균주 선정: 0.8g/L -1차 유전자 변이 균주 확립	55%
-발효공정 최적화 5L 발효조: 2.0 g/L	-Seed 조건 확립 -탄소원, 질소원 선정 -발효농도: 1.0 g/L	50%
-정제공정 개발 균체분리 조건 확립 흡착, 탈색수지 선정	-수지탐을 이용한 균주제거 및 흡착 공정 선정 및 실험 실시 -탈색공정 수지 선정	95%

2) 2006. 4.25 ~ 2007. 4.24. (2차년도)

가. 목표

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과
<b>2차 우수균주 개발</b> -유전공학 기법을 이용한 균주 개발 -대사공학적 돌연변이 방법을 이용한 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>•유전자 재조합균주 및 돌연변이주 proteome 분석</li> <li>•불필요 유전자 제거 및 필수 유전자 강화</li> <li>•돌연변이의 지속적 실시</li> <li>•선별균주 형질 안정화 실시</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•biotin 생산 핵심 유전자 분석</li> <li>•대사 경로 변형</li> <li>•개량형 재조합 균주개발: Plasmid 안정성이 확보된 고생산성 균주 개발 성공</li> <li>•1차 선별된 균주를 이용한 균주 안정화 및 2차 고역가 선별 작업 실시</li> </ul>
<b>Pilot scale 발효 최적화</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•50L 생물반응기를 이용한 배지 최적화 배양 조건 최적화.</li> <li>•Scale-up시 개선되어야 할 공정변수 설정</li> <li>•Fed-batch 발효 system을 이용한 biotin 생산성 향상</li> <li>•Pilot 정제 공정에 필요한 sample 공급</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•고농도 균체 배양 조건 확립</li> <li>•고농도 균체 배양 조건을 이용한 50L 발효조를 이용한 배양 조건 확립: 농도</li> <li>•scale-up 기본 조건 확립</li> <li>•정제용 발효 sample 확보</li> </ul>
<b>Pilot scale 정제 공정 개발</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pilot scale 정제 공정 확립: 균체 제거 및 컬럼 작업 최적화</li> <li>•결정화 조건 최적화</li> <li>•상업화 진행 현황</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•정제 수율 65% 달성</li> <li>•1차 샘플확보 : 분말제품, 액체 제품</li> <li>•시제품 조기 생산 후 상업화 spec 및 시장 조사 실시: 국내외 사료첨가제 생산 회사 및 사료 생산 회사와 당사 시제품을 이용한 상담 실시</li> </ul>

나. 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
<p>-우수균주 개발 Flask 기준: 2.0 g/L 이상</p>	<p>-돌연변이 균주 선정: <i>S. marcescens</i> MDBM1: 1.30 g/L <i>S. marcescens</i> MDBM2: 1.55 g/L -돌연변이를 이용한 개발된 고역가 균주를 host로 사용하여 Plasmid 안전성이 확보된 고생산성 유전자 변이 균주 개발: <i>S. marcescens</i> MDBM1-pJEYR: 1.95 g/L</p>	98%
<p>-발효공정 최적화 5L 및 50L 발효조: 3.0 g/L 이상</p>	<p>-고농도 균체 배양을 위한 Fed-batch 배양 조건 확립 -유전자 발현 조건 확립 -고농도 균체 배양과 유전자 발현 조건 최적화를 통한 고농도 biotin 배양 조건 확립 <i>S. marcescens</i> MDBM1-pJEYR: 2.85 g/L</p>	95%
<p>-정제공정 개발 컬럼 작업 최적화 결정화 조건 최적화</p>	<p>-컬럼작업 최적화 및 결정화 조건 최적화를 통하여 정제수율 65% 달성 -사료첨가제 생산회사에서 요청한 시제품을 기존의 분말형태와 합성제품으로 생산이 불가능하며 사료첨가제 및 사료생산 회사에서 선호하는 형태인 액체상태로 시제품을 생산하여 공급하여 3차년 목표 일부를 조기 달성 함.</p>	110%

3) 2007. 4.25 ~ 2008. 4.24. (3차년도)

가. 목표

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과
<b>3차 우수균주 개발</b> 유전공학 기법을 이용한 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>•유전자 재조합균주 및 대변이주 proteome 분석</li> <li>•불필요 유전자 제거 및 필수 유전자 강화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<i>bioH</i> 유전자 cloning 및 이 유전자가 biotin 생성에 미치는 영향</li> <li>•재조합 plasmid 안정성 향상 및 지속적인 고생산 재조합 균주 선별로 인한 biotin 생성량 향상</li> <li>•<i>S. marcescens</i>에 재조합 plasmid 역도입 및 biotin 생성량 증대된 재조합 3차 균주 제조</li> </ul>
<b>Pilot 및 상업화 발효조를 이용한 발효 최적화</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•당농도 최적화 및 feeding 방법 개선에 의한 biotin 생산성 향상</li> <li>•Scale-up시 개선되어야 할 공정변수 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•균주 성장 속도 조절에 의한 biotin 생산성 향상</li> <li>•20KL 상업화 발효 실험 실시</li> </ul>
<b>Pilot scale 정제 공정 개발</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pilot scale 정제 공정 확립: 균체 제거 및 컬럼 작업 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•정제용 발효 sample 확보</li> <li>•정제 수율 70% 달성</li> <li>•98% 분말 시제품 확보</li> </ul>
<b>상업화</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•국내외 biotin 상업화 및 시장현황 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•국내 및 중국 발효회사 설비를 이용한 생산 가능성 협의</li> <li>•국내외 biotin 판매회사와 공동 판매 방안 협의</li> </ul>



## 나. 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
-우수균주 개발 Flask 기준: 3.0 g/L 이상	• <i>S. marcescens</i> 에 재조합 plasmid 역도입 및 biotin 생성량 증대된 재조합 3차 균주 제조-2.3g/L	98%
-발효공정 최적화 5L 및 50L 발효조: 4.0 g/L 이상	•당 feeding 개선 •발현조건 개선 •5L 발효조: 4.85 g/L •50L 발효조: 4.66 g/L •20KL 발효조: 3.85 g/L	121%
-정제수율	•컬럼작업 최적화 및 결정화 조건 최적화를 통하여 정제수율 70% 달성	100%
-제품품질	•분말제품 기준 98% 달성	100%
-생산원가	•발효농도가 예상보다 20% 이상 향상되어 원료값등의 상승에도 불구하고 500 USD/KG 이하로 생산이 가능할 것으로 판단 됨	100%

## 2. 기관별 연구 목표 달성도 및 기여도

목표	목표 달성도	기여도	
		주관기관 롯데	위탁기관 한국의국어대학교
-발효농도 :고역가 생산균주 개발 :발효공정 최적화	목표: 4g/L 달성: 4.85 g/L 달성도: 121%	51%	70%
-정제공정 수율	목표: 70% 달성도: 100%	100%	
-시제품 품질	목표:98% 달성도: 100%	100%	

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 원료 사업화 방안

#### 1) 비오틴 국내의 시장 현황

2005년 비오틴 가격은 600 USD/KG 까지 하락하였으나 현재 생산원가의 상승 및 생산량의 감소로 인하여 2008년 1월 현재 국내 비오틴 수입가격은 1,500 USD/KG (자료제공: (주)트리온)까지 상승하였다. 비오틴 가격은 계속 상승할 것으로 예상되어 시장일부에서 사재기 현상까지 발생하고 있다고 함. 표 1에서와 같이 국내 사료용 비오틴 시장은 2% 기준으로 110톤 정도 요구되고 있으며 매년 5% 내외 성장하고 있다고 알려져 있음. 현재 건강식품, 화장품 및 의약품에도 비오틴의 사용이 점점 증가하고 있으며, 순수 비오틴 기준으로 약 8-10톤의 시장을 형성하고 있는 것으로 알려짐.

표 1. 비오틴 국내 수입 현황

연도	2% 비오틴 물량	98% 비오틴 기준
2006년	93 톤	4.65 톤
2007년	110톤(30 USD/KG)	5.5 톤

(주)트리온 자료 제공

#### 2) 국내에서 원료 생산 방안

현재 개발된 기술지표를 이용하여 비오틴을 국내에서 직접 생산하여도 충분히 경쟁력이 있을 것으로 판단된다. 표 2에서와 같이 50KL 발효조를 이용하여 1년에 50억원 가까운 매출을 발생시킬 수 있을 것으로 판단되며, 이것은 비교적 고부가가치 항생제로 알려져 현재 국내에서 생산되고 있는 Vancomycin 보다 더 부가가치가 높을 것으로 판단된다. 이를 근거로 현재 국내에서 가동되지 않거나 가동률이 현저히 낮은 30KL 이상의 발효조를 보유하고 있는 K사, B사, W사 등으로부터 발효조를 임대하여 직접 생산하거나 공동으로 생산하기 위한 협의를 진행 중에 있다. 이들 회사는 모두 식품첨가 및 사료첨가용 발효제품을 생산할 수 있는 제조 허가를 보유하고 있음. 기타 국내의 발효회사는 대부분 의약품을 생산하는 GMP 공장으로서 사료첨가제를 생산하기에는 너무 비싼 설비이며, 향후 의약품 또는 식품, 화장품 첨가제로 비오틴을 생산할 경우에는 활용이 가능하다고 판단 됨. 또한 아미노산, 핵산을 생산하는 CJ, 대상, 바스프사에서 보유하고 있는 발효조는 100톤 이상의 발효조로 너무 대형발효조이며 임차하여준 실적도 전무하여 사실상 사용이 불가능하다고 판단 됨.

표 2. 50KL 발효조를 이용한 비오틴 예상 생산량

발효조 및 기술지표	예상 생산량
발효조: 50KL 배양액 35KL 발효농도: 4g/L 정제수율: 70%	$\text{생산량} = 35,000 \text{ L} * 4\text{g/L} * 0.7 = 98,000 \text{ g} \approx 100 \text{ KG}$ 1년 생산량 = $100\text{KG} * 40 \text{ batch} = 4,000 \text{ KG} = 4\text{톤}$ 50KL 1기 예상 매출액 = $4,000 \text{ KG} * 1,200 \text{ USD/KG}$ $= 4,800,000 \text{ USD} \approx 48\text{억원}$

### 3) 해외에서 원료 생산 방안

비오틴 가격 하락 또는 국내에서 생산하기에 원가 부담이 너무 클 경우를 대비하여 중국 발효회사와 공동으로 비오틴 생산에 관한 방안을 협의를 진행 중에 있음. 중국 중경에 위치한 H사는 매우 적극적으로 당사 기술이전을 희망하고 있으며, 현재 H사는 20기 이상의 50KL 발효조를 보유하고 있어서 당사가 요청할 경우 언제든지 비오틴 생산이 가능하다고 제안을 한 상태임. 그러나 중국에서 당사 기술을 이용하여 비오틴을 생산하는 것은 매우 신중하게 결정하여야 할 사항으로 판단되어 결정을 미루고 있는 상태임. 하지만 국내뿐만 아니라 100톤 이상의 전 세계 시장을 목표로 원료를 생산할 경우 국내에서 생산은 한계가 있을 것으로 판단되어 중국에서 생산도 향후 신중이 결정하여야 할 것으로 판단 됨.

## 2. 완제 사업화 방안

### 1). 사료첨가제 사업화 방안

#### 가. 액체 비오틴 사료첨가제 개발

- 회사명: 제일바이오 주식회사
- 회사 현황: 닭사료로 사용되는 biotin 첨가제 복합제품 생산 중
- 협일자: 제일바이오 김 동 건 연구소장
- 협약내용: 현재 제일바이오는 2% biotin을 사용하고 있지만 적기 수송이 가능하다면 액체 lysine과 같이 액체로 된 2% biotin 용액 공급을 희망 함. 액체 biotin은 생산공정이 단순하여 생산단가도 낮아질 것으로 예상 됨. 당사는 제일바이오와 미팅을 통하여 2% 액체 biotin을 생산하기 위한 정제공정을 개발 함.

#### 나. 분말 비오틴 사료첨가제 개발

- 회사명: (주)트리온, (주)이엘티사이언스
- 회사 현황: 김치유산균을 이용한 사료첨가제 생산 및 해외 판매
- 협일자: (주)트리온 장기은 사장, (주)이엘티사이언스 최형규 대표이사

-협약내용: 현재 이엘티사이언스 동물사료첨가용 의약품 및 콧데에서 개발한 김치유산균을 이용한 유산균이 첨가된 특수 사료를 생산하고 있음. 동시에 트리온은 이엘티사이언스에서 생산중인 제품을 국내 및 해외 시장에 등록 및 판매를 수행하고 있음. 당사가 비오틴 원료를 생산하여 공급할 경우 비오틴이 포함된 특수사료를 이엘티사이언스에서 생산하여 동남아, 중국 및 유럽에 트리온사를 통하여 수출하는 방안을 논의 중에 있음.

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

특별한 자료 없음

## 제 7장 참고자료 및 문헌

Akatsuka, H., Kawai, E., Imai, Y., Sakurai, N., and Omori, K., 2003. The *Serratia marcescens bioH* gene encodes an esterase. *Gene*. 302, 185–192.

Bower, S., Perkins, J.B., Yocum, R.R., Howitt, C.L., Rahaim, P., Pero, J., 1996. Cloning, sequencing, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon. *J. Bacteriol.* 178, 4122–4130.

Davis, B.D., Mingioli, E.S., 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.* 60, 17–28.

Izumi, Y., Morita, H., Sato, K., Tani, Y., Ogata, K., 1972. Synthesis of biotin–vitamers from pimelic acid and coenzyme A by cell–free extracts of various bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 264, 210–213.

Izumi, Y., Morita, H., Tani, Y., Ogata, K., 1974. The pimelyl–CoA synthetase responsible for the first step in biotin biosynthesis by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 38, 2257–2262.

Kiyasu, T., Nagahashi, Y., and Hoshino, T., 2001. Cloning and characterization of biotin biosynthetic genes of *Kurthia* sp. *Gene*. 265, 103–113.

Koga, N., Kishimoto, J., Haze, S.I., and Ifuku, O., 1996. Analysis of the *bioH* gene of *Escherichia coli* and its effect on biotin productivity. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 482–487.

Marquet, A., Bui, B.T., Florentin, D., 2001. Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitam. Horm.* 61, 51–101.

O'Regan, M., Gloeckler, R., Bernard, S., Ledoux, C., Ohsawa, I., Lemoine, Y., 1989. Nucleotide sequence of the *bioH* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 17, 8004.

Otsuka, A.J., Buoncristiani, M.R., Howard, P.K., Flamm, J., Johnson, C., Yamamoto,

R., Uchida, K., Cook, C., Ruppert, J., Matsuzaki, J., 1988. The *Escherichia coli* biotin biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the bio operon. *J. Biol. Chem.* 263, 19577–19585.

Serebriiskii, I., Vassin, V. M., and Tsygankov, Y.D., 1996. Two new member of the BioB superfamily: cloning, sequencing and expression of *bioB* genes of *Methylobacillus flagellatum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 175, 15–22

Sakurai, N., Imai, Y., Masuda, M., Komatsubara, S., Tosa, T., 1993a. Construction of a biotin-overproducing strain of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2857–2863.

Sakurai, N., Imai, Y., Masuda, M., Komatsubara, S., Tosa, T., 1993b. Molecular breeding of a biotin-hyperproducing *Serratia marcescens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3225–3232.

Sakurai, N., Imai, Y., Masuda, M., Komatsubara, S., Tosa, T., 1994. Improvement of a d-biotin-hyperproducing recombinant strain of *Serratia marcescens*. *J. Biotechnol.* 36, 63–73.

Sakurai, N., Akatsuka, H., Kawai, E., Imai, Y., Komatsubara, S., 1996. Complete sequence and organization of the *Serratia marcescens* biotin operon. *Microbiology* 142, 3295–3303.

Tomczyk, N.H., Nettleship, J.E., Baxter, R.L., Crichton, H.J., Webster, S.P., Campopiano, D.J., 2002. Purification and characterization of the BIOH protein from the biotin biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* 513, 299–304.