

(S4-B) 재조합 라이신 생산균주에서 라이신 생산 증가의 Mechanism

허 원
주식회사 삼양사

서론

Nagahari 등(1)은 여러 copy number의 플라스미드를 이용하여 trp Operon을 E.coli에서 증폭하여 tryptophan synthetase의 활성과 플라스미드의 copy number를 비교하였으나 단지 copy number가 늘어나면 tryptophan synthetase의 활성이 증가함을 알았으나 그 관계를 명확히 밝힐수는 없었다. Seo 등(2)도 플라스미드의 copy number와 β -lactamase의 발현정도의 상관 관계를 조사하였다. 즉 증폭된 유전자의 수만큼의 발현의 정도가 일정하게 비례하지 않는다는 것을 알수 있다.

유전자 증폭을 통한 아미노산 생산 균주의 개량에 있어서는 발현된 효소의 역가가 비례적으로 생산성의 증가에 반영되지 않는다고 보고 되고 있다(3-5). 그 이유는 우리가 실제로 측정 가능한 것은 In vitro의 특정 조건하에서의 반응속도이나 in vivo의 실제 반응 속도는 기질의 농도및 그외의 여러 환경적 요인에 의하여 결정되므로 측정된 활성과는 다를수 있으며 또 활성이 증가 되었을 경우 다른 단계에서 전체의 반응 속도가 조절될수 있다. 동시에 속도 조절 단계의 효소의 활성이 증가하더라도 그 증가된 활성에 의하여 발생하는 기질의 농도의 감소 및 Carbon Flow의 변화 그리고 다른 조효소의 공급의 변화등이 세포내에서의 반응 속도가 결정되며 여러 대사활동에 영향을 미칠것이다.

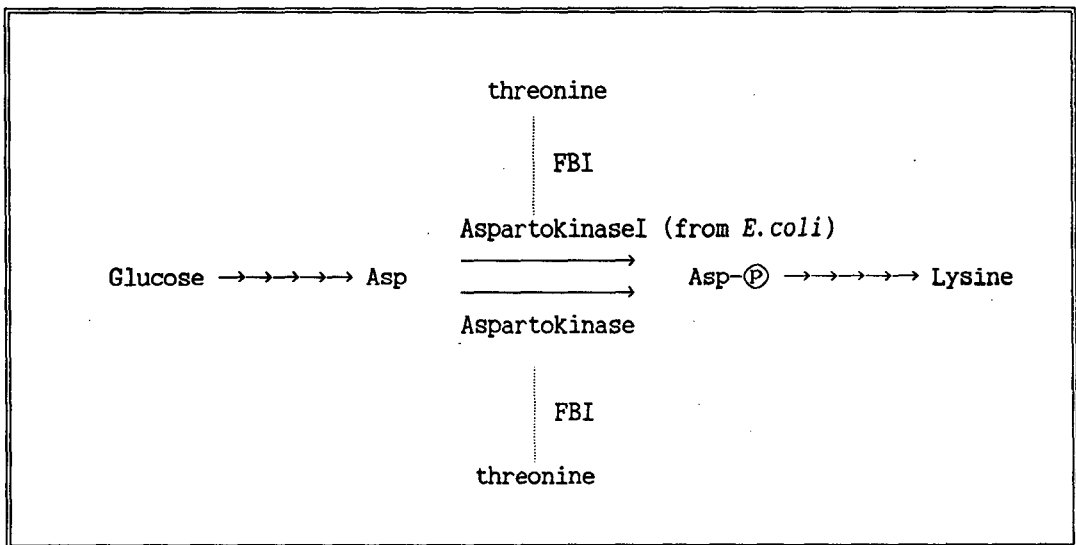
본연구는 보고된 재조합 라이신 생산 균주(6)의 라이신의 생산과 aspartokinase 활성의 증가를 측정 비교하고 이와 관련 라이신의 생성 속도측면과 carbon Flow의 변화를 분석하였다.

재조합 라이신 생산 균주

그림1 은 E.coli의 aspartokinaseI이 호모세린 요구주인 C.glutamicum에 도입되어

두개의 다른 aspartokinase를 가지는 재조합 라이신 생산 균주의 라이신 생합성의 부분의 dual aspartokinase를 나타낸 그림이다. 포도당에서 해당 과정 경로등을 거쳐 공급되는 Aspartic acid는 aspartokinase에 의하여 aspartyl phosphate로 변한다. 라이신의 생합성 속도 조절 단계로 추정되는 aspartokinase의 활성을 *E. coli*의 aspartokinaseI을 도입하여 증가시킴으로서 라이신 생산의 증가를 얻을 수 있었다(6).

그림 1



- FBI : Feed-back Inhibition
- Asp : Aspartic acid
- Asp-Ⓟ : Aspartic acid phosphate

라이신 생산성의 비교

그림2는 재조합 라이신 생산 균주인 *C. glutamicum* BF4-RM13과 모균주 BF4를 5L의 실험실 발효조에서 동일한 조건하에서 배양하여 라이신의 생산을 비교하였다. 이

때 용존산소는 agitation speed를 조절하여 2x의 DOT를 유지하였다. 트레오닌을 성장 결정 인자(growth limiting factor)로 배지를 조성하였고 초기에 150g/l의 설탕을 공급하였다. 그림2에서 시간에 따른 기질의 소모와 라이신의 생산 그리고 균체의 성장을 나타내었다.

재조합 균주는 80시간후에 59g/l의 라이신(LysineHCl)을 축적하였고 반면에 모균주는 29g/l의 라이신을 생산하였다. 반면에 라이신의 생산 곡성의 형태가 서로 상이하였다. 재조합 균주에서는 라이신은 late exponential phase에서 빠른 속도로 생산되기 시작하였으나 모균주에서의 라이신의 생산은 mid-exponential phase에서 부터 지속적으로 생산되었다.

재조합 균주에서의 라이신 생산에 영향을 미치는 환경적요인 즉 용존 산소 와 초기 당의 농도의 영향등도 조사하였다.

이 결과로 단순히 라이신의 생산성이 향상된 것뿐 아니라 라이신의 생산 형태가 도입된 재조합 유전자의 영향을 받아 변화하였음을 볼 수 있다. 이 원인은 주로 도입된 *E.coli*의 aspartokinase가 그것의 기질의 친화력과 트레오닌에대한 활성 저해 상수(feed-back inhibition constant)가 모균주인 *C.glutamicum*의 그것들과 매우 다르기 때문이라 생각된다. 균체의 성장과 함께 공급된 트레오닌이 감소하면 먼저 모균주의 aspartokinase의 활성저해가 풀리고 이후 계속 트레오닌이 감소하여 *E.coli*의 aspartokinase가 활성화 되어 라이신의 생합성의 속도에 기여하므로 재조합 균주의 라이신의 생산 형태가 달라졌다고 추정된다.

Aspartokinase의 활성 비교

재조합된 *E.coli*의 aspartokinaseI의 활성이 *C.glutamicum*에서 얼마나 유지되고 있는가를 효소 역가를 측정함으로써 확인하였다. Aspartokinase에 의하여 만들어진 aspartyl phosphate가 hydroxylamine과 반응하여 얻어지는 β -aspartyl-hydroxamic acid의 농도를 색변화를 통하여 측정하여 그 역가를 결정하였다.

Dual aspartokinase 시스템을 가지고 있는 *C.glutamicum* BF4-RM13과 모주인 *C.glutamicum* BF4를 동일한 조건에서 aspartokinase의 활성을 측정하였으며 동시

에 트레오닌의 활성 저해 효과를 보기 위하여 트레오닌의 농도를 변화하면서 aspartokinase의 활성을 비교하였다. 활성에 대한 기질의 농도의 영향을 보기 위하여 aspartic acid와 ATP의 농도를 변화 시켜가며 aspartokinase의 활성을 측정하였다. (Data not shown here)

표1에서 재조합 균주와 모균주의 비성장 속도(specific growth rate)와 aspartokinase의 활성, 라이신의 생산 속도, 전환율(Conversion Yield)등을 비교하였다. 비성장 속도는 큰 차이가 없고 aspartokinase의 활성은 2.4mU/min/mg protein 에서 4.3mU/min/mg protein으로 79% 증가 하였다. 라이신 최대 생산 속도는 113% 로 약 2배이상 증가 하였다. 그리고 라이신의 전환율은 0.29 에서 0.39로 약 34%의 증가를 보인다.

이 결과에서 Aspartokinase가 라이신의 생합성의 속도 결정 단계이므로 aspartokinase의 활성의 증가는 바로 라이신의 생산 속도에 반영되어야 한다. 그런데 여기서 라이신의 최대 생산 속도의 증가가 aspartokinase의 활성의 증가보다 더 크게 나타났다. 이유는 aspartokinase의 활성은 *in vitro*에서 특정 조건하에서 측정된 것으로 도입된 *E. coli*의 aspartokinaseI이 기질에 대한 친화력이 높기 때문에 *in vivo*에서의 활성은 측정된 값과는 다르기 때문으로 추정 된다.

aspartokinase의 활성의 증가로인한 라이신의 최대 생산 속도가 늘어 나더라도 전환율자체가 영향을 받아야 할 필요는 없다. 그러나 위의 결과는 *E. coli*의 aspartokinase의 도입이 라이신 생산 속도의 증가와 수반함과 동시에 도입된 AspartokinaseI은 기질에 대한 친화력이 매우 높으므로 중요한 두 intermediates 인 aspartic acid와 ATP의 세포내 농도를 저하시켜 미생물의 대사가 영향을 주었으리라 예상된다.

표 1

구 분	모균주 BF4	재조합균주 BF4-RM13	증가비(%)
μ_{max} (hr ⁻¹)	0.46	0.47	2
Aspartokinase activity* (mU/mg protein)	2.4	4.3	79
q_{pmax} (g/g/l)	0.030	0.064	113
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.29	0.39	34

*: measured at 20mM of aspartic acid and at 20mM of ATP

재조합 라이신 생산균주에서의 Carbon Flow의 변화

간단한 수학적 모델을 만들어 aspartokinase의 활성이 증가할때 aspartic acid의 균체 내에서의 농도의 변화와 이 변화에 의하여 유도되는 Carbon Flow의 변화를 살펴 보았다. 일반적으로 aspartokinase는 단순히 트레오닌에 의하여 feed-back inhibition을 받는다고 알려져 있으나 세포내의 aspartic acid가 높은 농도에서 트레오닌의 feed-back inhibition을 역전시키며 aspartic acid는 phosphoenol pyruvate decarboxylase를 feed back inhibition을 하여 oxalacetic acid의 공급을 제한하여 aspartic acid의 농도를 결정한다. 여기에 기질의 친화력이 다르고 활성 저해 상수가다른 *E.coli*의 aspartokinaseI이 도입되었을 때의 Carbon Flow를 조사하였다. (Data not shown here)

참고문헌

- (1) Nagahari, K., Tanaka, T., Hishmura, H., Kuroda, M. and Sakaguchi, K. (1977) *Gene* Vol.11:p141-152.
- (2) Seo, J. H. and Bailey, J. E. (1985) *Biotech. Bioeng.* Vol.27:p1668-1674.
- (3) Nakamori, S., Ishida, M., Takagi, H., Ito, K. and Sano, K. (1987) *Agric. Biol. Chem.* Vol.51:p87-91.
- (4) Morinaga, Y., Takagi, H., Ishida, M., Miwa, K., Sato, T., Nakamori, S. and Sano, K (1987) *J. Biochem.* Vol.98:p1621-1630.
- (5) MIwa, K., Tsuchida, T., Kurahashi, O., Nakamori, S., Sano, K. and Momose, H. (1983) *Agric. Biol. Chem.* Vol.47:p2329-2344.
- (6) 허 원 (1991) *생물산업* Vol. :p