Fermentation and Proteomic analysis of *E. coli* mutant FC which produced soluble glucan

Ji-Yong Kim, Li-Hua Jin, Jung Kyu Kim and Jung-Heon Lee
Department of Chemical Engineering, Chosun University
TEL: +82-62-230-7259, FAX: +82-62-230-7226

Abstract

In this study, the full gene of the putative β-1,3-glucan synthase catalytic subunit(gi:40556679) in *Agrobacteriujm* sp. ATCC31750 was cloned into *E. coli* BL 21(DE). We found that putative β-1,3-glucan synthase catalytic subunit full gene mutant(*E. coli* mutant FC) produced soluble glucan.instead of curdlan(insoluble glucan).

Key word : 2-DE, *Agrobacterium* sp. ATCC31750, *E.coli* mutant FC

Introduction

Agrobacterium sp. ATCC31750은 sucrose를 포함한 무기배지에서 성장하며 질소원이 고갈되었을 때 생체고분자인 β-1,3-glucan을 생성한다. *Agrobacterium* sp.에서 생산되는 β-1,3-glucan(curdlan)은 그 특이한 성질로 인하여, 식료품, 건축 등 여러 분야에서의 응용에 많은 관심을 받고 있다. *Agrobacterium* sp. ATCC31750에서 curdlan 합성에 결정적인 작용을 하는 Enzyme은 Putative β-1,3-glucan synthase catalytic subunit(gi:40556679)로 그 효소의 gene 정보는 NCBI등 gene bank에서 찾아볼 수 있다. 본 연구실에서는 Putative β-1,3-glucan synthase catalytic subunit의 full gene site를 벡터에 실어 *E.coli* BL21에 넣었으며 그 단백질이 *E. coli* 에서도 발현되게끔 함으로써 *E.coli* BL21도 β-1,3-glucan을 생성하게 하고자 하였다. 실험 결과 *E. coli* mutant FC는 full gene site를 가지고 있음에도 불구하고 curdlan은 생산하지 않았다. 그러나 대신 수용성 glucan을 생성하는 것을 발견하였다.

본 연구에서는 2-DE(2 dimensional electrophoresis)를 이용하여 *E. coli* mutant FC의 단백질 발현을 분석하여 metabolic pathway 상의 변화를 알아보고자 한다.

Materials and mathods

(1) 균주 및 배양 조건

균주는 *E. coli* mutant FC을 사용하였으며 flask culture은 ampiciline 100mg/L를 포함한 LB배지에서 키웠다. 대조균주로는 *E. coli* BL 21을 사용하였으며 항생제가 없는 LB 배지에서 키웠다. 발효는 5L 발효기(Kobio-tech, InCheon, Korea)에서 3L의 영양 배지(Sucrose 100g/L, NH_4Cl 4g/L, KH_2PO_4 1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, Trace element 10ml/L)로 진행하였다. 단 *E. coli* mutant는 100mg/L 의 ampiciline을 첨가하여 준다. 균주는 OD_{600}값이 1일 때 10% 접종하여 사용하였으며 배지의 초기 pH는 7.0으로 고정하였으며 발효 중 pH는 2N HCl과 8N NaOH로 조절하였다. 발효과정 중 발효 조 내 온도는 시종 37℃로 aeration은 0.5 vvm.으로 유지시켜준다. 그리고 2D용 샘플은 발효시작 8시간 지점, 18시간 지점, 48시간 지점으로 하였다.

(2) 2-DE 용 샘플 준비

세포는 4℃, 8000rpm에서 15분간 원심분리하고 모아진 세포는 Tris-HCl(40mM, pH 8.0)으로 3번 세척하고 500ul의 lysis buffer(8M Urea, 4%(w/v) Chaps, 40mM Tris, 4%(v/v) Protease inhibitor)에 녹인다. 다음 10회씩 15번 sonication을 진행하고 세포 찌꺼기는 4℃, 12000rpm에서 60min 원심분리 시켜 제거 한다. 단백질 표준곡선은 BSA(Bovine serum albumin)으로 만들었고 단백질은 Bio-Rad protein assay kit(Hercules, CA, U.S.A)로 정량했다. 정량된 단백질(45ug)은 2D-cleanup kit(Amersham biosciences)로 염제거 하고 10%(v/v) 1M DTT, 0.5%(v/v) Triton X-100, 0.5%(v/v) IPG buffer(pH 3-10)이 포함되어 있는 Rehydration buffer(8M Urea, 0.5%(v/v) Triton X-100, 0.005% Orange-G, final volume 320ul)에 녹여 사용하였다. Urea, Triton X-100, IPG buffer, Tris와 Chaps, BSA, Orange-G 등 약품은 Amersham bioscience와 Sigma 것으로 각각 사용하였다.

(3) 2-DE 및 이미지 분석

2-DE의 처음 단계인 Isoelectric focusing은 Pharmacia Biotech IPGphor Electrophoresis system(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)으로 20℃에서 진행되었다. IPG(immobilized pH gradient)gel strip은 pH 4-7인 linear 타입으로 사용하였으며 rehydration을 overnight 진행하고 Isoelectric focusing은 500V로 2h, 1000V로 0.5h, 2000V로 0.5h, 4000V로 0.5h, 다음 마지막으로 8000V로 70000V · h 될 때까지 진행한다. 45ug의 단백질이 로딩되어있는 IPG gel strip은 Seeblue plus2 marker(invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A)와 함께

12.5%의 polyacrylamide gel에 의해 분자량에 따라 분리된다. SDS-PAGE는 60V로 2h, 다음 150V로 10h 좌우로 Bromophenol blue가 gel 밑부분에 갈 때 까지 내렸다. Silver staining 은 Rabilloud(1999)의 방법에 의해 진행되었다. 염색된 gel은 UMAX powerlook 1100 scanner에 의해 스캔되었으며 스캔된 이미지는 Image Master software V4.01(Amersham Bioscience)를 이용하여 분석하였다.

(4) Protein Identification

단백질 identification을 진행할 때에는 swiss prot에 있는 *E. coli* 2D-map을 reference map으로 사용하여 Image Master software V4.01로 spot matching을 한다.

Results and discussion

2DE 용 샘플을 얻기 위하여 *E. coli* mutant FC와 대조균 *E. coli* BL21을 반응기에서 발효를 진행하였다. Figure1에서 그 결과를 보여주었다. 그림에서 보다시피 *E. coli* mutant FC는 대조균에 비하여 성장속도가 다소 늦으나 하루만 지나면 그 성장이 빨라져서 최종 cell mass는 같게 된다. 그러나 대조균은 glucan을 생성하지 않는 반면 *E. coli* mutant FC는 3.5g 넘는 glucan을 생산해 냄을 알 수 있다.

하여 2DE gel 분석을 거쳐 *E. coli* mutant FC의 glucan 합성 pathway를 알아보았다.

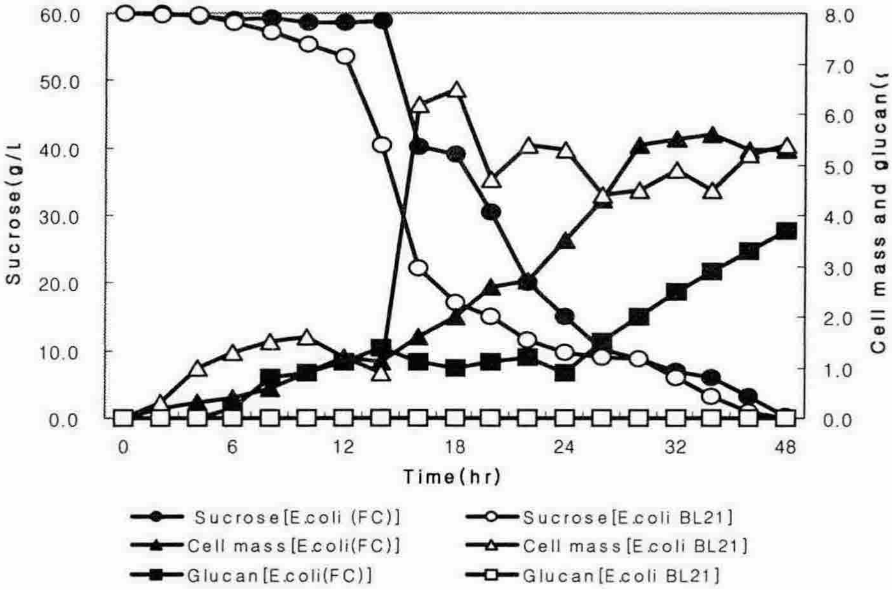

Figure 1. Fermentation results

References

1. Harada, T., Misaki A.and H. A bacterial gel forming (1,3)-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968, **124**, 292-298.
2. Harada, T., Sato, S. and Harada, A., Curdlan. *Bulletin of the Kobe Women's University*, 1987, **20**, pp. 143164.
3. Lee, J.H. and Lee, I.Y., Optimization of uracil addition for curdlan (beta-glucan) production by *Agrobacterium* sp, *Biotechno. Lett.* 2001, **23**, 11311134.
4. Lee, J.H. and. Park, Y.H, Optimal production of curdlan by *Agrobacterium* sp. with feedback inferential control of optimal pH profile, *Biotechnol Lett.*, 2001, **23**, 525530.
5. Harada, T., Terasaki, M. and Harada, A., Curdlan. In: Whistler, R.L. and BeMiller, J.N., Editors, 1993. ,*Industrial gums*, Academic Press, New York, 1993, 427-445.
6. Lee I.Y., Curdlan, Biopolymers, in: A. Steinbuchel, E.J. Vandamme, S. de Baets(Eds.), Polysaccharides I: Polysaccharides from prokaryotes, *Wiley-VCH, Weinhein*, 2000, **5**, 135-158.
7. Lee, J.H., Lee, I.Y., Kim, M.K. and Park, Y.H., Optimal pH control of batch processes for production of curdlan by *Agrobacterium sp.*, *J.I nd. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **23**, 143-148.