

Fed-batch 배양에 의한 알칼리내성 *Bacillus* 속 Promoter 의 발현조절

조석철 · 박혜영 · 김인규 · 조형용 · 변유량*

연세대학교 식품공학과

Controlled Expression of Promoter from Alkali-tolerant *Bacillus* sp. DNA in Fed-batch Culture

Cho, Suk-Chul, Hei-Young Park, In-Gyu Kim, Hyung-Yong Cho and Yu-Ryang Pyun*

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

The influence of glucose concentration on cell growth rate and on the expression level of the strong promoter obtained from alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA was studied. In fed-batch culture, the promoter activity could be maximized by maintaining a very low level of glucose concentration in the broth and glucose consumption rate below 1.08g/g cell·h. The induction of the promoter was possible by addition of sporulation medium after the cell was grown in growth medium with only low level of CAT activity.

Bacillus 는 안전하고 유용한 숙주로 인정되어 expression vector 의 개발이 활발히 연구되고 있으며 유전학적 및 생화학적 연구도 집중되고 있다(1-4).

Yu 등(5)은 알칼리내성 *Bacillus* sp. YA-14 를 토양에서 분리하고 이 균주의 chromosomal DNA로부터 현재 사용되고 있는 expression vector 인 pPL708 보다 약 3배의 강력한 활성을 가지고 있는 7.9kb의 유전자 단편을 promoter probe vector 인 pPL 703에 cloning시켜 플라스미드 p-12를 제조하였다. Subcloning 조작을 통하여 6.6kb의 플라스미드 p-12B1을 제조하고 이를 공여균주에 삽입시켜 CAT 활성을 측정하므로써 이 promoter의 유전 생화학적 특성을 검토하였다. 그 결과 이 promoter는 글루코오스에 의하여 catabolite repression을 받고 chloramphenicol에 의해 유도되며 발현은 포자형성과 관련이 있음을 밝혔다(6,7).

Promoter의 이와 같은 특성은 재조합 DNA의 expression vector로서 바람직한 성질로서 숙주의 증식

을 저해시키지 않으면서 목적 유전제품의 효율적 생산이 가능하다. 즉 영양생육 단계에서는 promoter의 활성을 낮게 유지하도록 배양조건을 조절하여 세포를 증식시키고 원하는 균체농도에 도달하면 promoter의 활성을 최대화할 수 있는 조건을 부여함으로써 유전자 발현을 최적화할 수 있을 것이다(8-10).

따라서 본 연구에서는 이와 같은 특성을 지닌 plasmid p-12B1의 host-vector system을 이용하여 glucose를 첨가하는 시기, 농도 및 첨가 방법에 따른 영향을 검토하여 promoter의 발현을 조절할 수 있는 배양조건을 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주

Promoter probe vector pPL703의 제한효소 중 *Bam* H1과 *Pst* 1 위치 사이에, *Bacillus* 속 YA-14 자체 chromosomal DNA의 강력한 promoter가 cloning되어 있는 plasmid DNA p-12B1을 함유한 알칼리내성 *Bacillus* sp. YA-14를 사용하였다(5,6).

Key words: *Bacillus* sp. promoter, CAT

*Corresponding author

배지 및 배양방법

균의 보존배지로는 NY agar broth 를 사용하였고 균의 배양을 위해서는 2×SSG(modified schaeffer medium) 포자형성 배지를 사용하였다(11).

Chloramphenicol 10 μg/ml 를 포함한 2×SSG 배지 50ml 에 접종균을 1백금이 접종한 것을 종배양액으로 하고, 본배양은 2×SSG 및 GS 배지가 100ml 함유된 500ml flask 에 종배양액을 3% 가 되도록 접종하여 37°C에서 배양하였다.

발효조를 사용할 경우에는 2l jar fermenter(Marubishi Co., Model MD-250)를 이용하여 working volume 1l, 교반속도 300rpm 및 통기량 1.0 VVM 으로 조절하였으며, continuous fed-batch 를 할 경우에는 tubing pump(Sage Instruments, Model 375A)를 이용하여 배지 및 glucose, chloramphenicol 등을 연속적으로 공급 해주었다. 이 때 초기의 배지량은 850ml 이고 glucose 및 chloramphenicol 은 150ml 의 배지에 희석하여 공급 하였다.

균체량의 측정 및 글루코오스의 정량

일정시간에 채취한 배양액을 적당하게 희석하여 spectrophotometer(Shimazu Co., UV-120-02)로 optical density 550nm 에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량직선으로부터 건조균체량을 구하였다.

배양액 중에 잔존하는 glucose 의 정량은 enzyme kit (Sigma Co., Catalog No.510-A)를 이용하여 결정하였다.

CAT(chloramphenicol acetyl transferase)의 활성 측정 및 포자형성도 측정

Promoter 의 활성 정도를 비교하기 위한 CAT 활성 측정은 Hitachi model 200-20 spectrophotometer 를 이용하여 Show 등의 방법을 약간 수정하여 측정하였다(12). CAT 의 1 unit 는 37°C에서 acetylation 되는 chloramphenicol 의 micromole 수로 나타내었다. CAT 비활성은 CAT unit 를 균체량으로 나누어 준 값으로 정하였다.

배양시간에 따른 균주의 포자형성도는 위상차현미경(Olympus Co., 15×40)을 이용하여 적당히 희석한 시료를 염색하지 않고 육안으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

글루코오스 첨가시기가 promoter 의 활성에 미치는

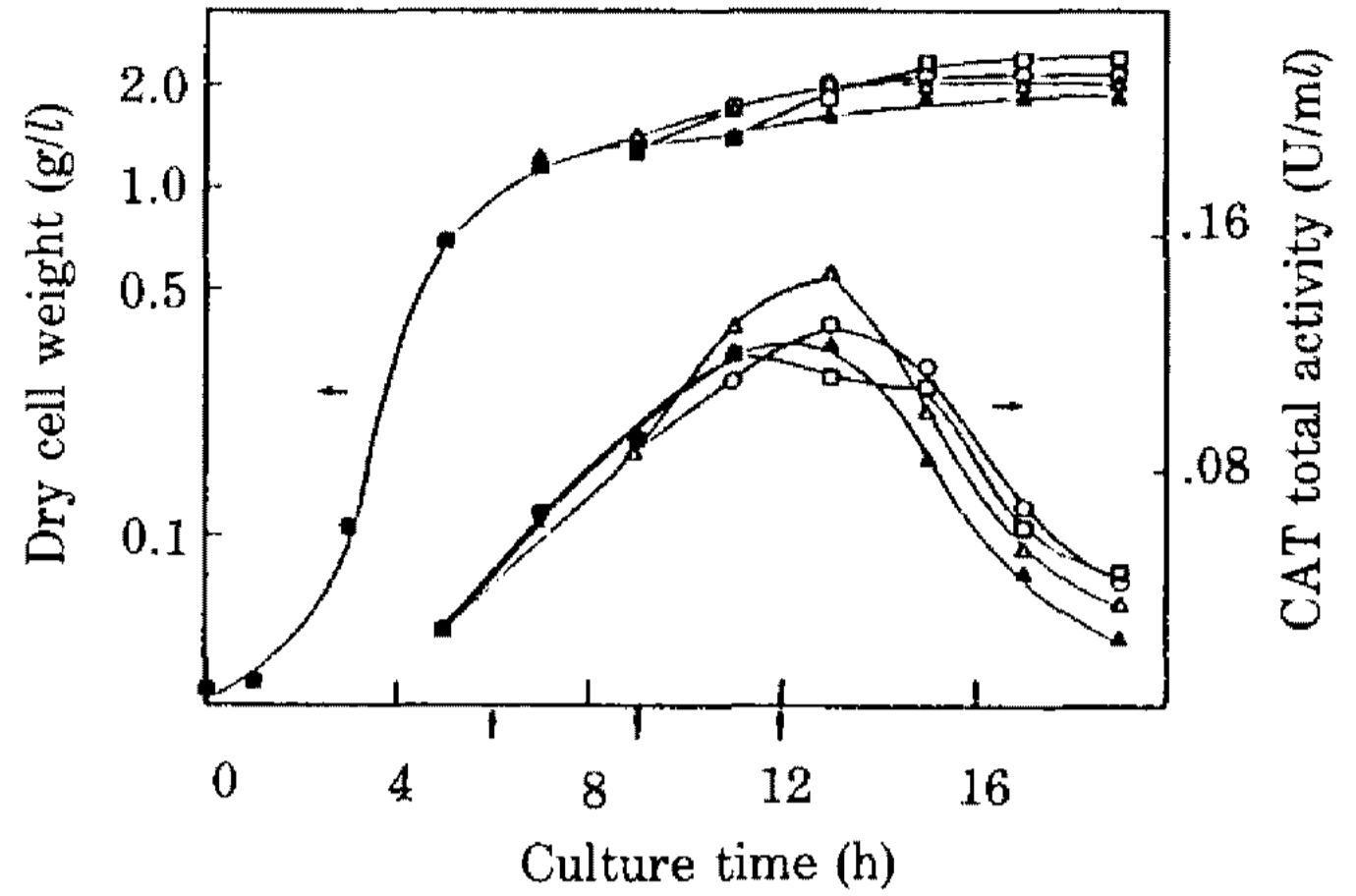


Fig. 1. Effect of glucose addition time on CAT total activity.

The arrows beneath the abscissa indicate time point at which glucose was added to the culture. ▲ control, △ 6 hours, ○ 9 hours, □ 12 hours

영향

플라스미드 p-12B1 이 포함하고 있는 promoter 는 전보에서 밝힌 바와 같이 초기 글루코오스 농도 0.1% 일 때 CAT 활성이 가장 높았으나 배지 중 글루코오스가 거의 고갈되는 시점부터 CAT 활성이 나타나기 시작하여 2~3 시간 후에 CAT 비활성이 급격히 감소하는 현상이 관찰되었다. 유전제품을 대량생산하기 위해서는 가능한 한 promoter 활성이 높은 균체를 고농도로 배양하는 것이 바람직하므로 catabolite repression 을 받지 않을 정도의 저농도로 글루코오스를 계속 첨가해 줄 필요가 있었다. 그러나 그 첨가시기와 양 및 첨가방법이 CAT 비활성에 큰 영향을 미칠 것으로 예상되었다. 따라서 회분 배양의 어느 시점부터 글루코오스를 첨가하는 것이 CAT 의 활성을 높게 유지할 수 있는 가를 살펴보기 위하여 초기 0.1% glucose 가 첨가된 2×SSG 배지 200ml 를 1l 삼각플라스크에 넣고 배양하다가 각각 6, 9, 12 시간 후에 배양액을 50ml 를 250ml 삼각플라스크에 분주한 후 0.1% 의 글루코오스를 재첨가시켜준 결과를 Fig.1 에 나타내었다.

최종 균체량은 글루코오스를 첨가해준 시간이 늦을수록 각각 1.6, 1.67, 1.76 g/l 로 약간 높아졌다. *Bacillus* sp. YA-14 균주를 활발히 생육할 때 부산물로서 다당류를 생산하는데(13), 첨가시기가 빠를수록 부산물 생산에 이용된 글루코오스량이 많기 때문에 최종 균체량에 차이가 생기는 것으로 생각된다.

한편, CAT 총활성을 살펴보면 대수증식기 말기 즉 배지 중 글루코오스가 거의 고갈된 시점인 배양 후 6시간에 글루코오스를 재첨가한 경우에 첨가 직후는

catabolite repression에 의해 CAT 활성이 약간 감소하였다가 그 후 다시 증가하여 글루코오스를 추가로 첨가하지 않은 경우의 총활성 0.12 U/ml에 비해 0.154 U/ml로 증가되었다. 포자가 형성되기 시작하는 시점인 배양 후 9시간에 글루코오스를 재첨가하였을 때는 최대 CAT 총활성은 control에 비해 약간 증가하였으며, CAT 총활성이 감소하기 시작하는 시점인 배양 후 12시간에 글루코오스를 재첨가하였을 때는 활성이 증가되지 않고 계속 감소하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 글루코오스가 고갈된 후 글루코오스의 재첨가 시간이 늦을수록 CAT 활성의 증가에 미치는 효과가 적어졌는데, 이는 시간이 경과할수록 포자가 많이 생성되거나 autolysis가 일어나 세포의 생리적 활성이 떨어지기 때문인 것으로 생각된다. 일반적으로 *Bacillus*는 protease 활성이 강하여 생산된 단백질을 분해시키며 배양 후 쉽게 autolysis되는 것으로 지적되고 있다(14). 따라서 CAT 활성을 더욱 증대시키기 위해서는 글루코오스를 첨가시켜 주는 시기가 중요하며 글루코오스가 고갈된 상태를 오랜시간 계속되지 않도록 하여야 하는 것으로 판단된다.

Fed-batch 배양

회분배양의 결과 배지 중 글루코오스가 고갈된 시점에서 글루코오스를 추가로 첨가함으로써 promoter의 활성이 증대되었으므로 글루코오스를 저농도로 연속적으로 공급해주면서 fed-batch 배양을 했을 때 promoter의 활성에 미치는 영향을 살펴보았다. 즉, fermentor를 사용하여 0.1% 글루코오스, 10 µg/ml의 chloramphenicol이 함유된 배양액 850 ml로 배양한 후 글루코오스가 고갈되고 CAT 비활성이 최대에 이르는 9시간 이후부터 글루코오스 2 mg/ml를 함유한 배지 150 ml를 7시간 동안 연속적으로 공급해 주어 배양 말기의 총 부피가 1 l가 되도록 조절한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fed-batch 배양한 경우 CAT 비활성은 회분배양 경우에 비해 최대값은 거의 비슷한 값을 나타내었으나 그 후 감소하는 경향이 완만하였다. 반면에 CAT 총활성은 회분배양 경우와 달리 감소되지 않고, 약 10시간 동안 거의 일정한 값을 유지하였다. 이 promoter는 공여균주내에서 vegetative 생육단계시 catabolite repression이 해제되는 저농도의 글루코오스에서 미약하게 발현되나 정지기 초기(T0) 및 정지기 3시간 후(T3)에 활성이 최대로 발현되는 것으로 보아 spo 0와 spo II 단계에서 특이적으로 인식하는 RNA polymerase holoenzyme에 의하여 전사가 일어나는 것으로 볼 수 있으며

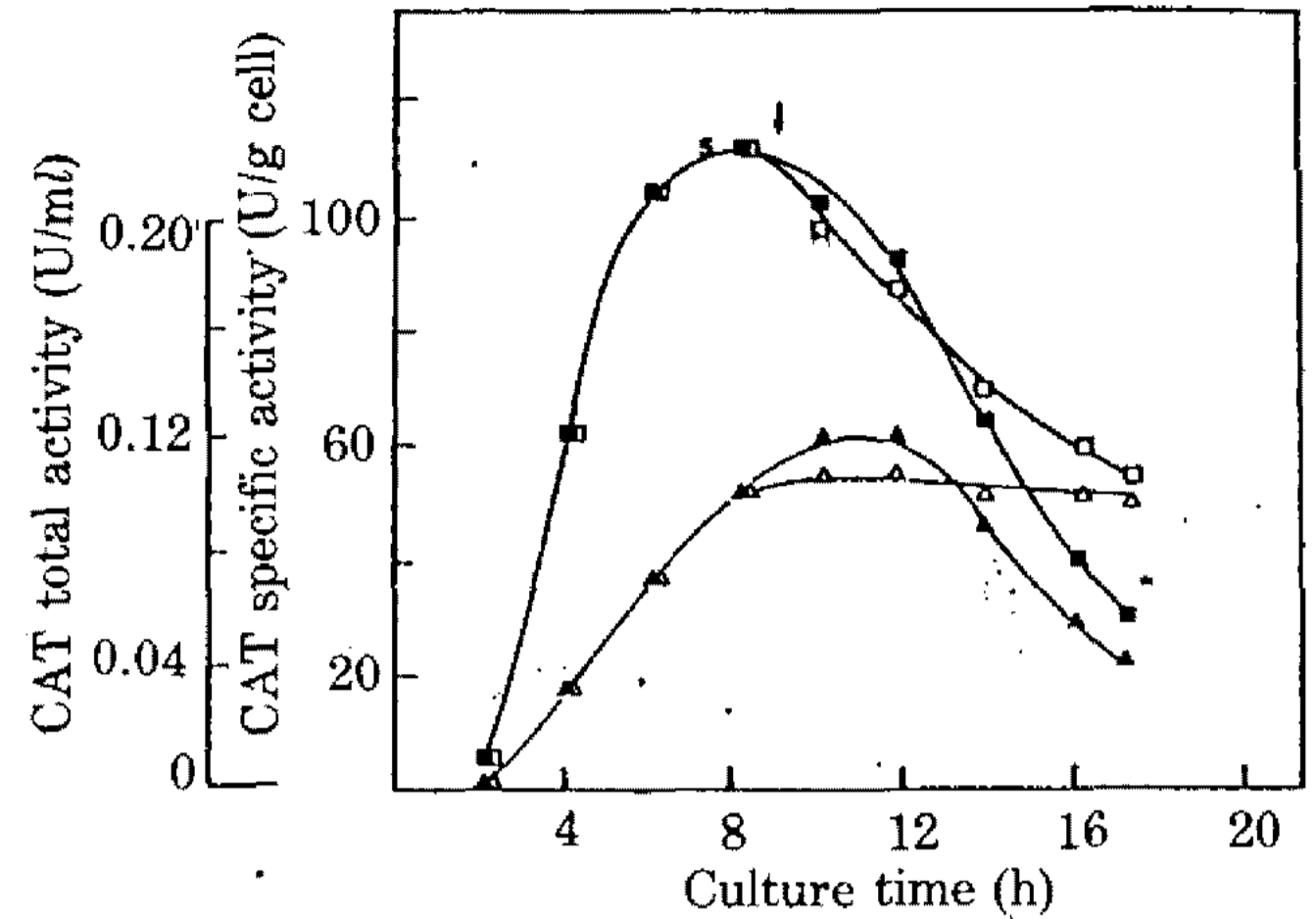


Fig. 2. Fed-batch culture of *Bacillus* sp. YA-14 containing plasmid p-12B1.

At 9 hours, glucose was added to the culture.

▲, ■: total and specific CAT activity in batch culture
△, □: total and specific CAT activity in fed-batch culture

(15), 또한 catabolite repression site가 존재할 것으로 추측되어 이 promoter 유전자의 조절기작을 밝히는 연구가 진행 중이다.

저농도의 글루코오스를 연속적으로 공급한 fed-batch에서는 포자형성은 관찰되지 않았으며, 회분배양에서 글루코오스 고갈이 어느 정도 지속되어 포자가 형성될수록 CAT 활성이 급격히 감소되는 결과(16)로 미루어볼 때 정지기 초기내지 포자형성의 초기단계로 세포활성을 조절함으로써 promoter의 활성이 높게 유지되는 것으로 생각되었다.

전술한 글루코오스 농도를 catabolite repression을 받지 않을 정도의 저농도로 유지한 fed-batch 배양에서 CAT 총활성은 유지되나 비활성이 감소되는 것은 배지 중 chloramphenicol이 부족하기 때문인 것으로 생각되어 chloramphenicol 농도를 subinhibitory level로 계속 유지하였을 때 CAT 활성에 미치는 영향을 살펴보았다.

Fermenter를 사용하여 초기 10 µg/ml의 chloramphenicol과 0.1%의 글루코오스를 넣어 배양시킨 후, CAT 활성이 최고값을 나타내는 배양 후 9시간부터 10 µg의 chloramphenicol과 2g의 글루코오스를 총 150 ml의 배지에 녹이고 이 배지를 18.75 ml/h의 유량으로 8시간 공급하여 fed-batch 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

글루코오스와 chloramphenicol을 연속적으로 첨가한 경우 첨가하지 않은 회분배양이나 글루코오스만 첨가한 fed-batch 배양에 비해 CAT 총활성은 계속적으로 증가하는 현상을 보여 18시간 후 0.175 U/ml에 이르렀고 균체농도는 첨가하지 않은 경우의 1.7 g/l 정도에서 2.5

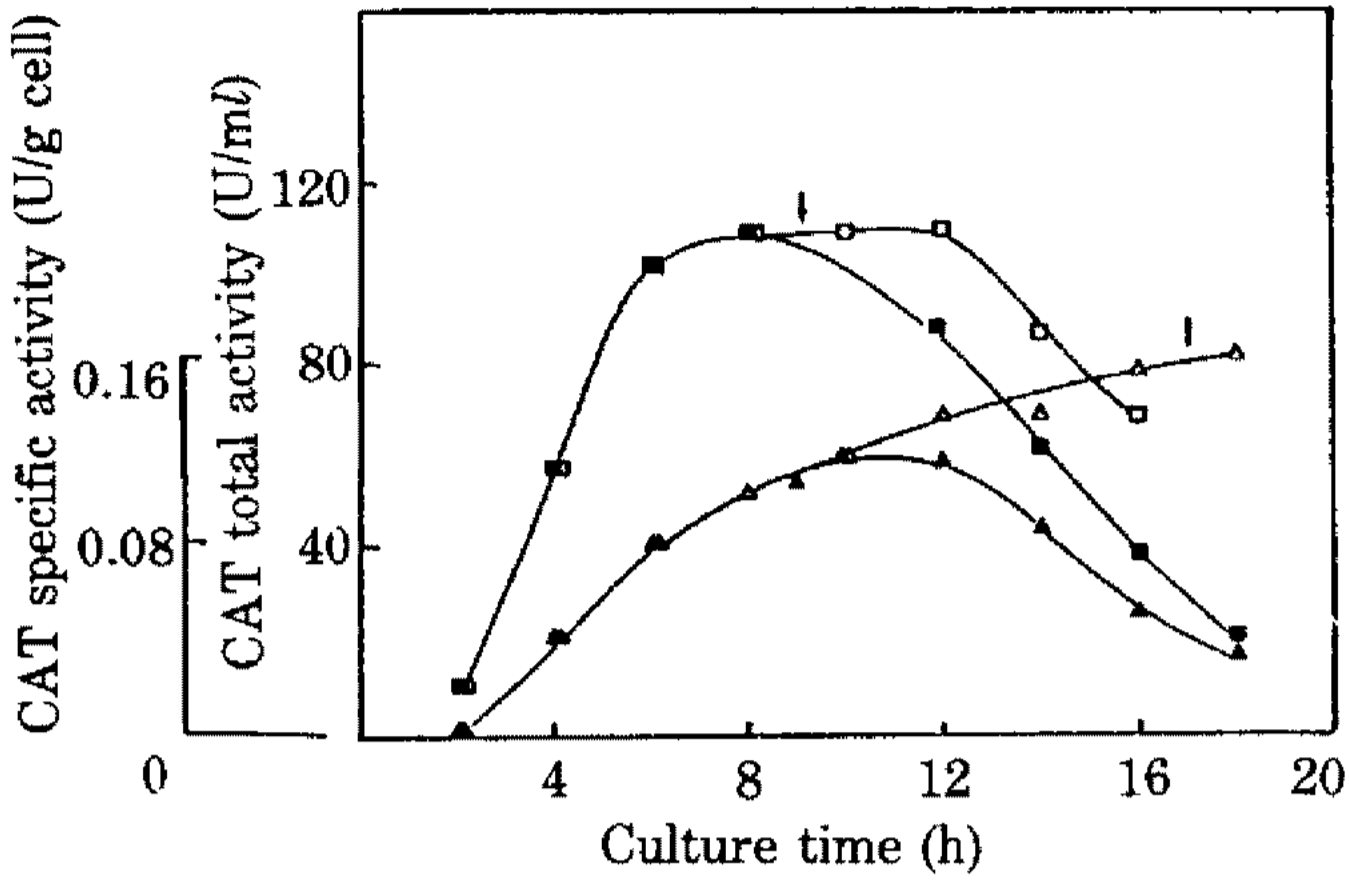


Fig. 3. Fed-batch culture of *Bacillus* sp. YA-14 containing plasmid p-12B1.

At 9 hours, glucose and chloramphenicol was added to the culture.

▲, ■: total and specific CAT activity in batch culture
 △, □: total and specific CAT activity in fed-batch culture

g/l로 증가되었다. 그러나 배양 말기에는 CAT 총활성의 증가율에 비해 균체증가율이 높아 CAT 비활성은 약간 감소하는 경향을 보였다.

글루코오스 소비속도가 promoter의 활성화에 미치는 영향

CAT 활성화에 가장 유리한 초기 조건인 0.1%의 글루코오스와 10 μg/ml의 chloramphenicol이 첨가된 배지

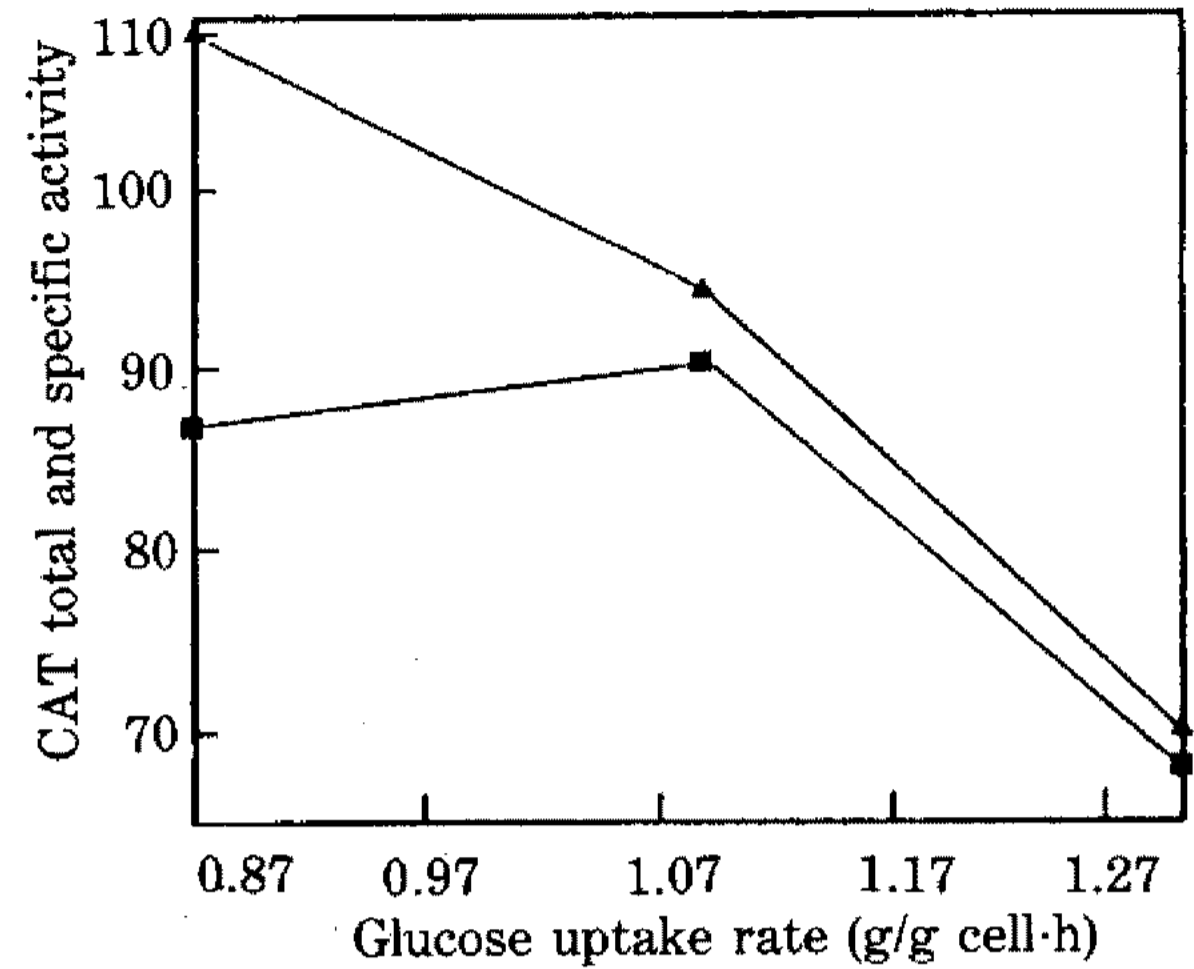


Fig. 4. Influence of glucose uptake rate on total and specific CAT activity.

▲: CAT total activity × 1000 (U/ml)
 ■: CAT specific activity (U/g cell·h)

에서 9시간 배양한 후, 글루코오스 연속첨가 농도를 각각 0.26~0.57 g/l·h로 달리하여 fed batch 배양 중 글루코오스 소비속도가 CAT 활성화에 미치는 영향을 보았다. Fig. 4에 나타난 것처럼 글루코오스 평균소비속도가 1.31 g/g cell·h인 경우에는 promoter의 활성화가 억제되어 CAT 비활성과 총활성이 낮고, 소비속도가 1.08 g/g cell·h 이하에서는 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 점으로 미루어 보아 배지 중 글루코오스 농도를

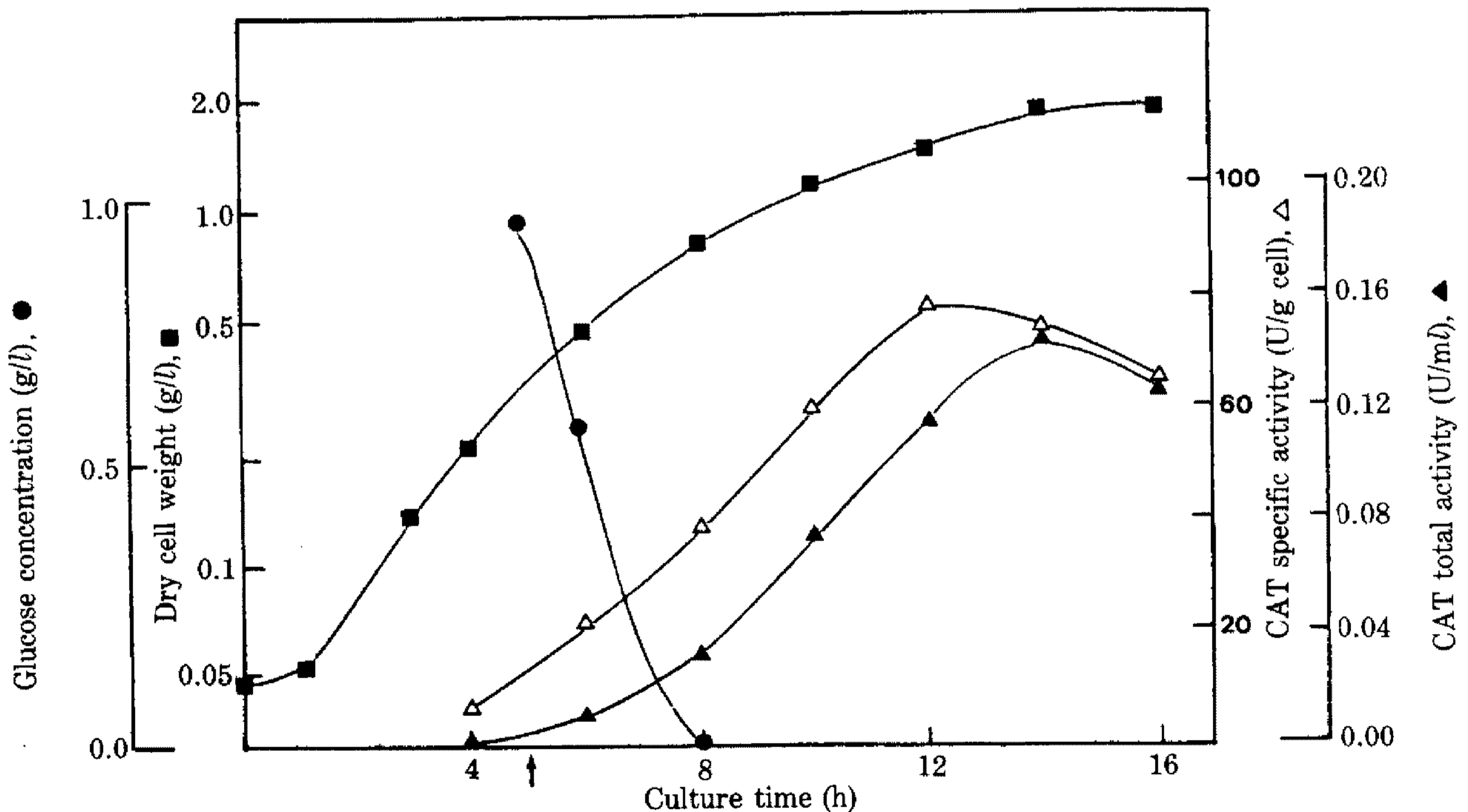


Fig. 5. Fed-batch culture of *Bacillus* sp. YA-14 containing plasmid p-12B1.

The arrow beneath the abscissa indicates a time point at which GS medium was replaced with sporulation medium.

catabolite repression이 완전히 해제될 수 있는 저농도로 유지하는 것이 중요하지만 글루코오스 소비속도를 낮게 유지하여 세포의 활발한 생육보다는 활성유지의 대사에 필요한 정도의 낮은 글루코오스 소비속도를 유지하는 것도 중요한 것으로 생각되었다.

배지조성의 변화가 promoter의 활성화에 미치는 영향

플라스미드 p-12B1 promoter를 이용하여 원하는 유전제품을 생산하기 위해서는 이 promoter의 특성을 이용하여 세포의 증식단계와 제품생산단계로 구별하여 발효하는 2단발효가 가능할 것이다(1-3).

이와 같은 가능성을 살펴보기 위하여 CAT 활성은 거의 나타내지 않고 생육만을 목적으로 하는 GS 배지에서 균체를 증식시킨 후 포자형성 배지인 2×SSG 배지를 혼합하여 균체생육과 CAT 활성을 측정하였다. Fig.5는 글루코오스 초기농도 3g/l인 GS 배지에서 5시간 배양한 후 2×SSG 배지를 1:1의 비율로 첨가하였으며, 혼합 후 글루코오스 농도는 1g/l, chloramphenicol 농도는 10μg/ml가 되도록 조절하였다. 포자형성 배지와 혼합한 후 약 2시간 후부터 CAT 활성이 나타나기 시작하여 약 10시간 후에 최대 총활성 0.145U/ml를 나타내었고 비활성은 78U/g cell로 batch 배양시의 60U/g cell보다 높은 값을 보여 균체생육과 유전자 발현을 구분하여 발효하는 것이 가능함이 입증되었다.

포자형성배지인 2×SSG 배지에서는 글루코오스의 첨가량을 증가시켜도 최종균체 농도는 큰 영향을 받지 않으므로 균체농도를 높이는데 한계가 있었으며, 이 promoter의 kinetics에 관한 연구가 곤란하였다. 이 promoter를 이용하여 실제 유전제품을 생산하기 위해서는 균체생육과 목적하는 유전자 발현을 조절할 수 있으며 promoter의 활성을 높게 유지할 수 있는 합성배지의 최적조성에 대해서 앞으로 계속 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

토양에서 분리한 알칼리내성 *Bacillus* sp.의 자체 chromosomal DNA에서 유래된 strong promoter를 지닌 plasmid p-12B1을 공여균주에 삽입시키고 이 promoter의 활성을 최적화할 수 있는 배양조건을 검토하였다.

글루코오스가 고갈된 시점부터 세포의 활성은 유지되거나 포자는 형성되지 않을 정도로 낮은 글루코오스 소비속도를 유지해 제한된 글루코오스를 연속적으로 공급해 줌으로써 promoter의 활성을 최대로 높일 수 있었다.

또한 배지조성의 변화로 균체를 생육시킨 후 유전자 발현을 유도하는 것이 가능하였으며, 이 점에 대해서는 보다 구체적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

사 사

이 연구는 87년 목적기초연구비 지원에 의하여 수행되었으며 한국과학 재단에 감사드립니다.

참고문헌

- Schaeffer, P.: *Bacteriol. Rev.*, **33**, 48 (1969).
- Priest, F.G.: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 711 (1977).
- Gryczan, T.J. and D. Dubnau: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1428 (1978).
- Palva, I., P. Lehtovaara., L. Kaarianen, M. Sibakof, K. Cantell and C.H. Schein, etc: *Gene*, **22**, 229 (1983).
- Yu, J.H., Y.J. Chung, K.S. Chung and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 239 (1986).
- Yu, J.H., B.T. Koo, Y.S. Park, Y.J. Chung, D.H. Bai and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 343 (1988).
- Yu, J.H., B.T. Koo and Y.J. Chung: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 188 (1989).
- Mongkolsuk, S., Y. Chiang, R.B. Reynolds and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **155**, 1399 (1983).
- Williams, D.M., E.J. Duvall and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **145**, 1162 (1981).
- Duvall, E.J., D.M. Williams, S. Mongkolsuk and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **158**, 784 (1984).
- David S. Goldfarb, S.L. Wang, T. Kudo and R.H. Doi: *Mol. Gen. Genet.*, **191**, 319 (1983).
- Shown, W.V.: *Method in Enzymol.*, **43**, 737 (1975).
- 조석철: 연세대학교 석사학위 논문(1989).
- Dean, D.H. and M.J. Kaelbling: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **22**, 369 (1981).
- Mongkolsuk, S. and P.S. Lovett: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3457 (1984).
- 김인규, 이석훈, 조형용, 변유량, 유주현: 산업미생물학회지, **18**, 137(1990).

(Received June 23, 1990)