

유전자 재조합 균주에서 플라스미드의 안정성과 발효 공정의 최적화

(Plasmid Stability of a Recombinant *Escherichia coli* and Optimization of Fermentation Processes)

박 성 훈

부 산 대 학 교 화 학 공 학 과

I. 서 론

Cohen 등¹⁾에 의해 유전자 재조합 기술이 처음 소개된 이후, 이 기술의 진보는 여러가지 의약품, 화학제품, 농약 등을 보다 경제적으로 생산할 수 있는 새로운 길을 열어 놓았다. 인슐린, 성장호르몬, 인터페론, 인터루킨-2, 여러 가지 진단시약 등은 이미 상품화 되었으며, 여러 다른 제품들도 활발히 개발되고 있다. 이들 대부분은 이미 자연적으로 분비되거나 존재하는 것들이지만 워낙 소량이어서 유전자 재조합 기술에 의하지 않고는 상업적 생산이 불가능했던 제품들이다.

유전공학 기술에 의해 개발된 제품을 경제적으로 생산하기 위해서는 생산성에 영향을 주는 유전적 요인 및 환경적 요인을 잘 파악하여야 한다.²⁾ 유전적 혹은 미생물의 내적인 요인으로는 DNA복제, 전사(transcription), 그리고 translation 등이 있고, 환경적 요인으로는 온도, pH, 배지조성, 용존 산소농도, 교반, 성장인자, 유도인자 등이 있다(Table 1). 이들 대부분 인자들은 전통적인 항생제 발효나 아미노산발효에서 오랜 기간을 두고 그 중요성이 증명된 것들로, 유전자 재조합 균주의 발효에서도 똑같은 중요성을 지닌다(Table 2). 때때로 유전적 요인과 환경적 요인은 서로 영향을 주기 때문에 이들 요인들을 따로 분리시키기가 어려울 때도 있다.

유전자 재조합 균주의 발효연구에서 빼놓을 수 없는 또 한가지 중요한 사항은 재조합 균주의 불안정성, 즉 유용한 유전정보가 자꾸 소실되는 경향이다. 유전정보가 플라스미드에 존재할 경우 불안정성은 크게 두가지로 구분되는데, 클론된 유전자내에서 발생하는 변형들 - 즉 deletion, insertion, 혹은 recombination-에 의한 구조적 불안정성(structural instability)과 벡터로 사용되는 플라스미드가 세포

분열시 불균등분배에 의해 소실되는 분배적 불안정성(segregational instability)이 그것이다. 전자의 구조적 불안정성의 경우 세포 내에 플라스미드는 존재하나 클론된 유전자가 변형을 받아 제기능을 못하게 되고 후자의 분배적 불안정성의 경우 플라스미드 전체가 소실되어 균체에 존재하지 않게 된다. 어느 경우나 재조합 균주의 생산능은 사라지고 우리가 필요로 하는 제품은 생산하지 못하게 된다. 이러한 유전적인 불안정성은 유전자 재조합 균주에 의한 발효의 스케일 업(scale-up)에 매우 어려운 문제를 야기한다. 왜냐하면 균주 보관용 고체배지에서는 100% 플라스미드를 가지는 단세포균으로 부터 미생물을 취하여 배양을 시작했다고 하더라도 생산용 발효조에 이르는 동안 여러번의 계대를 거치면서 생성능이 소실된 균주가 등장하고, 대부분의 경우 이러한 생성능이 없는 균들이 원래의 균보다 훨씬 빠른 속도로 성장하기 때문이다. 항생제 내성이나 영양요구성 등의 성질을 이용, 실험실적으로는 selection pressure를 가하여 플라스미드가 없는 미생물의 성장을 억제할 수 있으나 산업적 규모의 발효조에서는 이 방법을 실제로 적용하기가 어렵다.^{3,5)}

일반적으로 유전자 재조합 균주의 불안정성은 플라스미드내의 유전자 발현이 억제된 때보다 유도된 때, 즉 유용한 생성물의 생산이 활발할 때 더욱 심화된다. 이 경우 균주의 불안정성을 개선하는 한가지 방법은 적절한 유전자 스위치(genetic switch)를 사용하여 클론된 유전정보의 발현을 조절하는 것이다. 즉 균주의 활발한 성장이 요구되는 시기에는 유전자 스위치를 끄고(off) 균체의 성장이 더 이상 필요치 않는 단계에서 이를 켜서(on) 우리가 얻고자 하는 DNA산물을 대량으로 생산하는 것이다. 이것은 재조합 균주를 특별히 변화시키지 않고, 발효공정의 변화 만으로 생산수율을 현저히 향상시킬 수 있는 방법이다. 만일 이

Table 1. Genetic or microbial factors influencing the yield of a product from a cloned gene²⁾

1. Gene dosage	plasmid copy number regulation of replication
2. Transcription efficiency	promoter strength regulation of transcription
3. Translation efficiency	nucleotide sequence of ribosome binding site(Shine-Dalgarno sequence) distance between Shine-Dalgarno sequence and initiation codon secondary structure of mRNA codon usage
4. Stability of recombinant DNA	stability of cloned gene stability of plasmid
5. Stability of mRNA	structure of mRNA nuclease
6. Stability of protein	structure of protein or gene product protease
7. Host cell	host-vector interaction metabolic activity of host cell
8. Others	protein secretion proper termination between genes

Table 2. Environmental factors influencing the performance of fermentation processes²⁾

1. Medium preparation	concentration of various nutrients and growth factors concentration of inducer for cloned gene expression medium design for maintenance of recombinant cells
2. Process control and optimization	fine control of process variables(pH, temperature, DO level, etc.) optimization of induction time
3. Others	reduced shear rate when protein is secreted into medium optimization of dilution rate in continuous fermentation

중연속 배양장치를 사용하면, 1단 배양조는 성장단계(growth stage)로 그리고 2단 배양조는 생산단계(production stage)로 사용할 수 있어 미생물의 성장단계와 유용 물질의 생산단계를 물리적으로 분리시킬 수 있다.

본고에서는 열감수성 λ repressor(λ CI₈₅₇) - λ P_LO_L를 유전자스위치로 가지고 있는 유전자재조합균주를 model sys-

tem으로 사용한 경우에 있어서⁶⁾, 플라스미드 안정성에 미치는 여러 환경요인의 영향을 서술하고 또 이중 연속 배양기(two-stage continuous culture system)를 사용한 발효공정의 최적화에 대해 다루고자 한다. 사용된 재조합균주는 *Escherichia coli* M72(SM^R, lacZam, Δ bio-uvr, Δ trpEA2 [λ Nam7, Nam53, CI857, Δ HI])로 유전자재조합 플라

스미드인 pPLc23trpA1을 가지고 있다. 이 플라스미드는 pBR322의 ori site 및 ampicillin내성을 가지며 CI857 repressor가 활성을 잃는 38°C 이상의 온도에서 trpA1 유전자로부터 트립토판의 생합성에 관여하는 효소의 하나인 tryptophan synthetase α subunit(Trp α)를 생성한다(그림 1). 또한 대부분의 발효조건에서 앞서 언급한 두가지 플라스미드 불안정성 중에서 구조적 불안정성은 거의 발견되지 않았다. 사용한 이중 연속 발효장치의 개략적인 그림은 그림 2에 나타내었다. 첫번째 성장단계에서는 온도를 37°C이하로 유지하여 trpA1의 발현을 억제하고 이렇게 자란 균체를 두번째 생성단계로 옮겨 Trp α의 생산을 유도하고자 하였다.

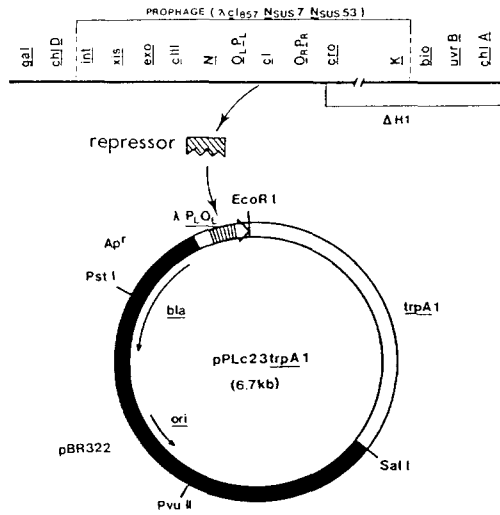


Fig. 1. Genetic maps of the part of host genome and plasmid pPLc23trpA1. Heat-sensitive repressors λCI 857 are encoded from the host genome and attach to the λP_LO₁ site to block the transcription of structural gene trp A1.

II. 플라스미드의 불안정성^{6, 7)}

II-1. 연속 배양기의 물질수지식

유전자 재조합 균주의 배양시 배양시간의 경과에 따라 플라스미드가 없는 균체(X⁻)가 생겨나고 전체 균체의 농도

생명과학

TWO STAGE CONTINUOUS CULTURE SYSTEM

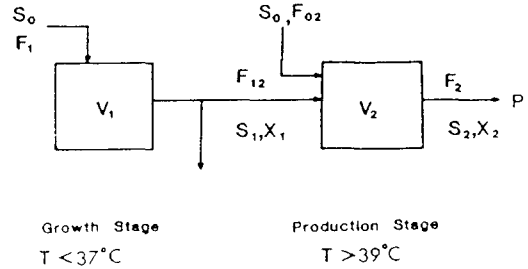


Fig. 2. Schematic diagram of a two-stage continuous culture system.

중X⁻의 비율은 시간에 따라 계속 증가하게 된다. 이것은 플라스미드를 가지는 균체(X⁺)가 세포분열시 플라스미드가 없는 X⁻를 생성하고(X⁻는 X⁺를 생성하지 못함) 또 일단 생성된 X⁻가 X⁺에 비해 상대적으로 빠른 성장속도를 보여주기 때문이다. 만일 X⁻가 X⁺를 생성하는 경향을 θ로 나타내고, X⁺ 및 X⁻의 비성장속도를 각각 μ⁺와 μ⁻로 표시하면 연속 배양기에서의 물질수지식은 다음과 같이 표현된다(분배적 불안정성만 고려).

$$\frac{dX^-}{dt} = -DX^- + \mu^-(1-\theta)X^+ \quad (1)$$

$$\frac{dX^+}{dt} = -DX^+ + \mu^+\theta X^+ + \mu^-X^- \quad (2)$$

위 식에서 D는 희석율로 배양액의 유입(혹은 유출)속도를 발효조의 부피로 나눈 값이다. 위 (1)과 (2)식은 θ가 클수록, 혹은 μ⁻/μ⁺의 값이 작을수록, 발효조내에서 X⁻의 농도는 빨리 감소하고 반대로 X⁺의 비율이 급격히 증가함을 보여준다.

II-2. 플라스미드의 안정성과 발효조의 운전조건

재조합 미생물의 안정성에 영향을 미치는 인자로는 플라스미드벡터의 성질 및 구성, 숙주세포의 유전적 형질, 유전자 발현정도 및 copy수, 배양온도, 제한 영양소의 종류, 희석율 등을 들수 있다.^{3, 9, 11)} 그림 3은 36°C, 정상상태에서 조업중인 연속 발효조에서 희석율이 플라스미드의 안정성에 미치는 영향을 보여준다(정상상태에서는 희석율과 비성장 속도가 같아지므로 균체 성장속도의 영향으로도 해석할 수 있다). 균체 성장속도의 비 α(=μ⁻/μ⁺)는 D의

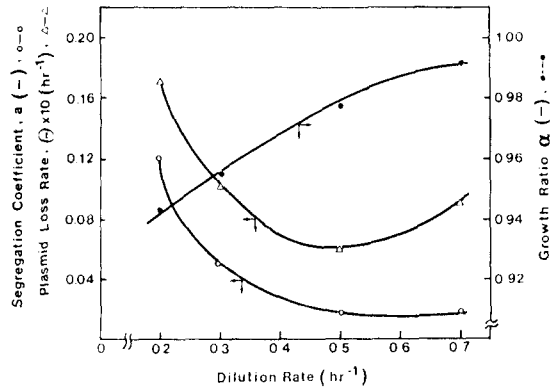


Fig. 3. Effect of dilution rate on specific plasmid loss rate θ (Δ), segregation coefficient a (\circ) and the ratio of specific growth rate $\alpha (= \mu' / \mu)$ (\bullet).

증가에 따라 1에 가까워지고 플라스미드의 소실율 ($\theta (= \mu' \theta)$)는 대략 $D=0.5$ 부근에서 최소값을 보여준다.

클론된 DNA 생성물이 만들어지지 않는 36°C 에서도 균체 성장속도의 비가 1보다 작은 것은 플라스미드 존재자체가 숙주세포의 성장에 저해요인이 됨을 의미한다. 그러나 α 의 값이 D 의 증가에 따라 1에 접근하므로 균체성장의 속도가 빠르면 빠를수록 저해의 정도는 감소하고, 이 경향은 아마도 균체 단위부계당 플라스미드의 중량이 D 의 증가에 따라 감소하는 것과 관계가 있는 듯 하다.¹¹⁾ 또한 플라스미드의 소실율 θ 혹은 불균등 분배 계수 a (segregational coefficient로 수학적 정의는 $(2N_i^+ - N_{i+1}^+)/N_i^+$ 이다. 여기서 N_i 와 N_{i+1} 은 각각 i -th generation과 $(i+1)$ -th generation에서 플라스미드를 가지는 미생물의 수)^{11, 12)}는 낮은 희석율 (혹은 비성장속도)에서는 증가하고 대강 $D=0.5\text{hr}^{-1}$ 이상에서는 거의 일정한 값을 보여주는데 이는 균체 성장속도가 빨라질수록 세포 분열시 X' 로부터 X 가 발생하는 확률이 줄어드는 것을 의미한다. pBR 322 origin을 갖는 플라스미드의 경우 균체 성장속도가 감소할수록 균체당 플라스미드의 양은 증가하는 것으로 밝혀져 있는데^{11, 14)}만일 세포분열시 플라스미드의 분배가 완전히 무작위적(random)으로 일어난다면 그림 3이 보여주는 것과는 반대로 μ 의 감소에 따라 a 가 감소하여야 하나^{8, 15)} 실험결과는 이와는 반대되는 경향이므로, 세포 분열시 플라스미드의 분배는 아마도 무작위적이 아닐 것이라는 결론이 가능하다. 물론

저성장속도에서는 플라스미드의 multimer가 형성되어 단위세포당 플라스미드의 수가 증가하는 효과를 일부 상쇄하지만 이것만으로는 그림 3의 경향이 전부 설명되지는 못한다.¹⁶⁾ 온도의 영향을 보기 위해 일정한 희석율에서 온도를 변화시키는 실험도 시도되었다.¹⁷⁾ 그러나 본고에서 다루고 있는 *E. coli*의 경우 온도가 37°C 이하일 때는, 즉 Trp α 의 생산이 억제된 때에는 α 나 a 값이 온도에 영향을 받지 않았다. 이는 비성장속도(μ)의 활성화 에너지가 X^+ 균주나 X 균주에 관계없이 일정하며, 또 세포분열시 X^+ 에서 X 가 생성될 확률이 온도에 관계없이 동일하다는 뜻이다.

클론된 DNA 생성물이 발현되는 경우도 α 와 a 를 이용 플라스미드의 불안정성을 정량적으로 표현할 수 있다. 일반적으로 α 는 0.9이하로 떨어지고 a 값도 현저히 증가되는 등 불안정성은 심화되며, 그 정도는 DNA 생성물의 양에 따라 증대된다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 그러나 Trp α 가 생성되는 조건에서는 α 와 a 의 값을 실험적으로 정확히 측정하기가 매우 어려운데 그 이유는 크게 2가지로 연속발효조가 정상상태에 도달하기도 전에 X' 균체가 모두 소실되는 것과 또 상당비율의 X' 균체가 평판고체배지(agar plate)에서 균집을 형성하는 능력(colony-forming ability)을 상실하기 때문이다.²⁰⁾ 두 번째 이유는 특히 심각한데 X' 와 X 의 실험적 구별이 replica plating에 의존하는 한 피할 수 없는 어려움이다.

III. 클론된 DNA 생성물의 합성

III-1. 생성물 합성에 영향을 주는 인자들

2단 연속 배양발효조에서 제1단계, 즉 성장단계의 목적은 플라스미드를 가지고 있어 클론된 DNA 생성물을 생산할 수 있고 다량의 DNA 생성물을 균체내에 축적할 수 있는 건강한 균체를 빠른 시간에 많이 배양하는 것이다. 이에 비해 제2단계, 즉 생성단계의 목표는 플라스미드의 안정화나 균체의 성장보다는 우리가 얻고자 하는 생성물을 많이 얻는 것이다. 물론 생성물의 합성속도는 플라스미드를 가지는 균체농도, X' 에 절대적으로 관련이 있지만 단순히 X' 만 높게 유지하는 것은 의미가 없다. 본고에서 다루고 있는 숙주-벡터시스템의 경우 최적화되어야 할 중요한 환경요인은 온도, 희석율, 그리고 미생물의 성장속도이다. 첫 번째 온도의 경우 mRNA의 생성속도를 조절하는 repres-

ser가 온도 감응성이므로 생물반응기의 운전 온도는 미시적으로 균체내 mRNA의 농도에 직접 영향을 준다. 또한 Trp α가 생성되는 translation속도는 mRNA량에 비례하므로 온도가 클론된 유전자의 전체발현과정(repressor'농도-전사속도-translation속도)을 지배하는 중심되는 인자임을 알 수 있다. 두번째 중요한 인자는 희석율(dilution rate) 혹은 D의 역수인 체류시간(retention time)이다. 일정한 온도에서 균체가 제2단계의 발효조에 체류하는 시간이 길어질수록 불활된 repressor의 양은 늘어나고 따라서 전사효율은 증대된다. 이는 배양 온도의 상승과 같은 효과이다. 그러나 발효조의 생산성은 단위 부피당 단위 시간당의 생성물 합성량으로 표현되기 때문에 전사효율의 증대가 항상 생산성의 증대를 가져오는 것은 아니다. 마지막으로 또한까지 중요한 인자는 균체의 성장속도이다. 1단 연속 배양의 경우는 정상상태에서 희석율이 항상 비성장속도(μ)와 동일하지만 2단 연속 배양의 제2단계 발효조에서는 희석율에 상관없이 비성장속도를 임의로 변경시킬 수 있다(아래식 7참조). 일반적으로 μ가 빨라진다는 것은 균체내의 모든성분들의 생성속도가 모두 빨라진다는 것을 의미하며 이는 전사속도 및 translation속도의 증가에 의해서만 가능하다. 그러므로 μ의 증가에 따라 플라스미드상에 클론된 유전인자도 그 발현속도가 비례하여 증가하게 된다. 이들 3가지 인자들 상호간의 관계는 그림 4에 주어져 있다.²¹⁾

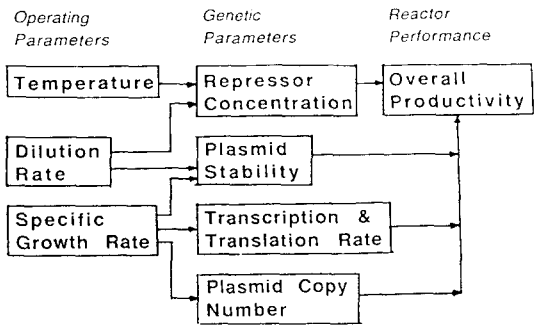


Fig. 4. Important operational and genetic parameters affecting overall productivity in recombinant fermentation.

III-2. 2단 연속 배양기의 물질수지식

2단 배양기에서의 물질수지식은 다음과 같이 표현된다.

$$\frac{dX_2'}{dt} = -D_2X_2' + D_{12}X_1' + \mu_2'X_2'(1-\theta_2) \quad (3)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = -D_2X_2 + D_{12}X_1 + \mu_2'X_2'\theta + \mu_2 X \quad (4)$$

$$\frac{dP_2}{dt} = -D_2P_2 + q_pX_2' \quad (5)$$

윗식에서 첨자 2는 제2단을 가리키고 D₁₂는 제1단에서 제2단으로 넘어오는 유량에 의한 제2단의 희석율(= F₁₂/V₂)을 의미하며, P₂는 생성물의 농도를 나타낸다. 한편 정상상태에서 균체의 성장속도는

$$\mu_2^{app} = (\mu_2'X_2' + \mu_2 X) / (X_2' + X_2) \quad (6)$$

혹은

$$\mu_2^{app} = D_2 - D_{12}(X_{1T}/X_{2T}) \quad (7)$$

로 주어지는데 첨자 app는 겉보기(apparent)값을 나타낸다. (7)식에서 X_{1T}와 X_{2T}는 각각 1단과 2단에서 총균체농도 즉 (X₁' + X₁)와 (X₂' + X₁)를 의미한다. (7)식은 2단 연속 배양의 실험 조건을 결정하는데 매우 유용한 식으로 2단에서의 미생물 성장속도 μ₂^{app}는 희석율 D₂와 같지 않음을 보여준다. μ₂^{app}는 D₂와는 무관하게 D₁₂, X_{1T}, X_{2T}의 변화에 따라 비교적 넓은 범위에서 변화할 수 있다.

III-3. 1단 연속 배양과 2단 연속 배양의 비교

그림 5는 연속 배양조를 하나 사용했을 때와 2개 연속으로 사용했을 때, 생성물 합성과 플라스미드의 안정성을 비교한 것이다. 그림에서 알 수 있는대로 1단배양조의 경우 X'의 비율[φ=X'/(X'+X)]이 10시간이내에 0으로 감소하고 Trp α의 생성도 15시간 이후에는 거의 중단된다. 이는 클론된 DNA산물의 생성이 플라스미드의 불안정성을 현저히 심화시킨다는 것을 의미한다. 반면에 2단 연속 배양의 경우에는 약 80시간까지 플라스미드의 안정성이 비교적 높게 유지되고 또한 Trp α의 생성도 계속된다. 그림에는 나타나지 않았지만 60시간 이후 X₂'의 비율이 감소하는 것은 성장단계 즉 1단에서 넘어오는 균체중 X가 생겨났기 때문이며, 만일 1단에서 플라스미드 안정성을 계속 높게 유지할 수 있다면 2단에서의 발효 효율과 발효시간은 더욱 증대될 수 있다.¹⁸⁾ 이 그림은 성장 단계와 생성 단계의 분리가 유전자 재조합 균주의 발효에 얼마나 효과적인가를 입증하는 증거가 된다.

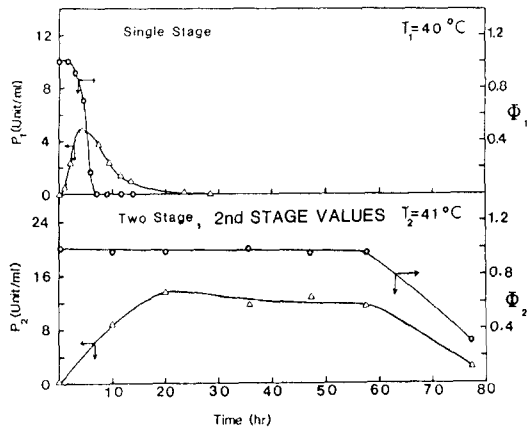


Fig. 5. Profiles of product concentrations and plasmid-harboring cell fractions in a single-stage continuous culture system(upper) and in the second-stage of a two-stage continuous culture system(lower).

III-4. Trp α 생성에 미치는 온도와 희석율의 영향

2단 연속 배양의 효과가 입증된 만큼 그 다음의 과제는 이를 최적화하는 일이다. 그림 6은 생성단계의 발효조 온도 T_2 가 q_p 에 미치는 영향을 보여준다(식 5참고). 41°C까지는 온도가 증가할수록 q_p 가 증가하나 그 이후에는 급격히 감

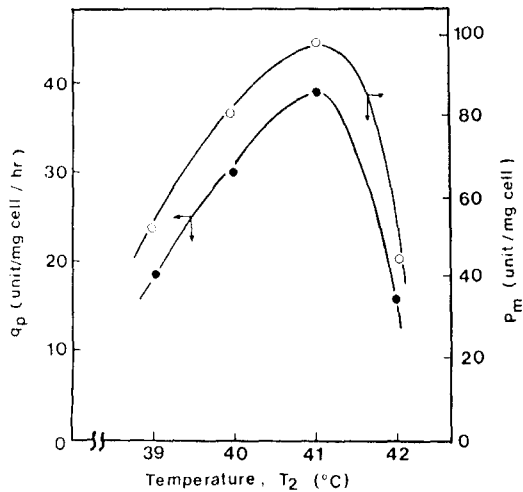


Fig. 6. Effect of operating temperature on specific production rate (●) and product accumulation per cell mass(○).

소한다. 41°C까지 q_p 의 증가는 repressor 불활성화에 이은 전사효율의 증가 때문으로 여겨지며²²⁻²⁵⁾ 그 이후의 급격한 감소는 Trp α의 파괴(열 혹은 protease에 의해) 혹은 inclusion body 생성에 따른 분석상의 문제 때문이 아닌가 여겨진다. 그림 7은 희석율의 영향을 보여준다. 발효조 온도를 41°C로 고정했을 때 희석율의 증가는 q_p 의 감소를 가져온다. 이는 앞에서도 언급한 대로 체류시간의 감소에 따른 전사효율의 감소 때문으로 여겨진다.

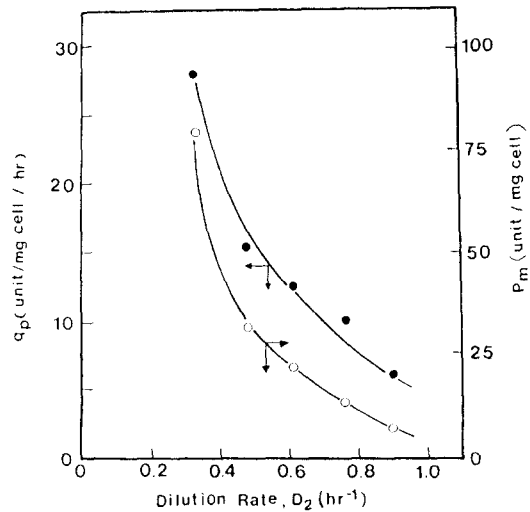


Fig. 7. Effect of dilution rate on specific production rate (●) and product accumulation per cell mass(○).

III-5. 균체 성장속도와 유전인자 발현속도

그림 8은 균체 성장속도가 단위 시간당 플라스미드 상에 생성되는 단백질 수, 즉 유전인자 발현속도(q , specific gene expersion rate)에 미치는 영향을 보여준다. 물질수지식에 의하면 겉보기 정상상태(apparent steady-state)에서 q 는¹⁹⁾

$$q = \frac{q_p}{G_p} = \frac{D_2 P}{X_2 \cdot G_p} \quad (8)$$

여기서 G_p 는 플라스미드의 농도로 단위는 number of plasmid DNA/g cell이며 실험적으로 측정된다. q 가 μ_2^{app} 에 따라 직선적으로 증가하는 것은 세포성장속도와 전사 및 translation속도가 비례한다는 의미이다. 즉 주어진 유전자 재조합 균주에서 Trp α의 생성은 growth-dependent로 일차

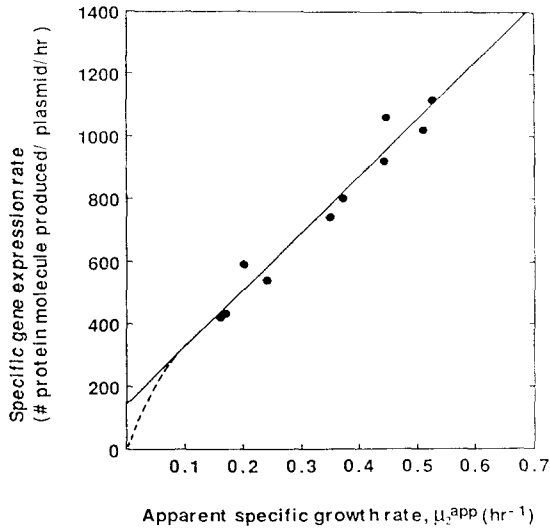


Fig. 8. Effect of specific growth rate μ_2^{app} on specific gene expression rate ; $D_2=0.7hr^{-1}$ and $T_2=40^\circ C$ were kept constant.

대사 산물의 생성 때와 같은 범주에 들어간다는 뜻이다. 그러나 실험값의 외삽(extrapolation)에 의해 Y절편을 구했을 때 0이 아닌 양의 값이 얻어지는데 이는 성장하지 않는 균체도 DNA생성물을 아주 느린 속도로 합성할 수 있다는 의미이다. 현실적으로 μ_2^{app} 가 $0.1hr^{-1}$ 이하에서는 q_p 를 구하는 것이 거의 불가능하므로 실제로 Y-절편값을 실험에서 측정하는 것은 어렵지만 그림 8의 결과는 엄밀히 말해 (9)의 Leudeking-Piret model을 만족한다.

$$q_p = a\mu + b \quad (a \text{와 } b \text{는 상수}) \quad (9)$$

따라서 그림 8의 결과는 단순히 경험적으로 얻어진 Leudeking-Piret model에 불리적인 그리고 생물학적인 의미를 부여한 것이 된다.

보통 유전자 재조합 균주가 아닌 일반적인 균주에서 genome당 총 단백질량은 거의 일정하고 균체 성장속도와는 무관하다. *E. coli*와 *Saccharomyces typhimurium*의 회분배양에서 균체가 균형성장(balance growth)을 하고 있을 때 총 단백질량의 염색체 DNA에 대한 비는 약 20mg protein/mg DNA로 주어지는데^{26, 27} 본 실험의 Trp α 생성의 경우 약 50mg protein/mg DNA로 2.5배 가량 높음을 알 수 있다. 한편 본 실험에 사용된 λP_L system을 잘 알려진 다른 system들, 즉 *lac* 혹은 *trp* promoter를 갖는 경우와 비교할 수도 있다(Table 3). 이 표에서는 각 유전자에 의해 전사된 mRNA를 측정할 것이 아니고 최종 단백질의 생성량을 측정하였기 때문에 translation효율의 영향(ribosome binding site의 구조, RBS와 initiation codon간의 거리, codon usage 등²⁸)까지 포함하고 있다. 그러나 개략적으로는 위의 세가지 promoter들은 비슷한 유전자 발현효율(number of protein molecules/DNA molecule)을 가진다고 할 수 있겠다.

그림 9는 균체 성장속도가 q_p 에 미치는 영향을 보여준다. 비록 실험값들이 다소 오차가 있기는 하지만 대체로 $\mu_2^{app}=0.45hr^{-1}$ 부근이 최적임을 알 수 있다. 이 경향은 플라스미드의 농도와 클론된 유전자의 발현효율이(그림 8) 서로 복합되어 나타난 것이다. 즉 낮은 μ_2^{app} 에서는 단위 유전자당

Table 3. Comparison of gene expression efficiency for three different promoter systems under induced or derepressed condition⁴⁾

promoter	Gene product	Approximate number of molecules per DNA molecule	Features related to gene expression
<i>lac</i>	β -galactosidase	1500	wild-type <i>lac</i> operon : induced
	<i>lacro</i>	4000	promoter mutant(<i>lac</i> PUV5) ; cloned in pBR322 derivative
<i>trp</i>	anthranilate synthetase	4000	constitutive mutant(<i>trpR</i>) chromosomal <i>trp</i> operon
	tryptophan synthetase β	7700	constitutive mutant(<i>trpR</i>) chromosomal <i>trp</i> operon
λP_L	tryptophan synthetase α	5700	λ repressor mutant(CI857) ; induced at $41^\circ C$; cloned in pBR322 derivative

생성되는 단백질 양이 감소하나 반대로 단위 균체량 당 플라스미드의 수는 증가하게 되어 (gene-dosage effect) 이들이 서로 상충되는 효과를 갖는데, $\mu_2^{app}=0.45\text{hr}^{-1}$ 부근에서 종합적인 결과가 가장 최적으로 얻어지게 된 것이다 (그림 5참조).

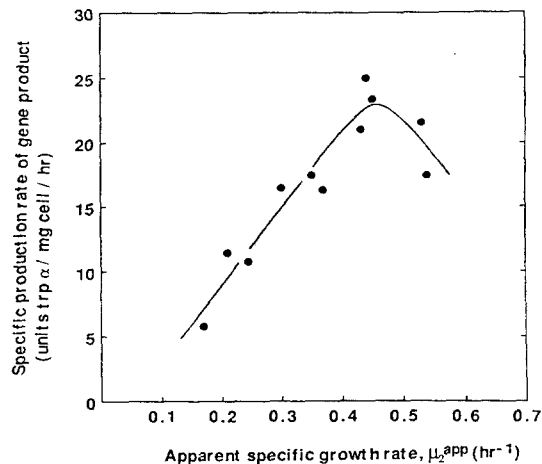


Fig. 9. Effect of μ_2^{app} on specific production rate (q_p) of the cloned gene product ; $D_2=0.7\text{hr}^{-1}$ and $T_2=40^\circ\text{C}$.

IV. 맺는 말

지금까지 유전자 재조합 균주의 발효에 있어서 플라스미드의 안정성과 발효공정의 최적화에 대해 개략적으로 서술하였다. 클론된 DNA의 발현은 플라스미드의 안정성을 크게 저해하며, 저하된 플라스미드의 안정성은 재조합 균주의 생산성을 많이 떨어뜨린다. 본고에서 설명한 2단 연속 발효조를 이용하여 성장단계와 생성단계를 분리할 경우 이 문제를 효과적으로 개선할 수 있고 발효시간도 상당시간 연장이 가능하다.

최적 발효 조건은 각각의 숙주-벡터 시스템, 사용항 배지, 생성물 등에 따라 크게 변한다. 동일한 숙주-벡터 시스템의 경우도, 사용하는 배지에 따라 온도, 회석율 또는 성장속도에 의존하는 정도가 달라지고 또 최적값도 다 변한다. 뿐만 아니라 온도, 회석율 그리고 성장 속도의 최적 조합도 여러가지가 있을 수 있으므로, 숙주-벡터 시스템,

사용배지, 생성물 등이 결정되면 발효조건 최적화는 여러 조합을 고려에 넣어 체계적으로 적절히 이루어져야 한다.

마지막으로 강조하고 싶은 것은 발효조건 최적화가 균체 내 플라스미드의 자기복제, mRNA로의 전사, 단백질로의 translation, 더 나아가 미생물 전체의 생리와 밀접하게 관련이 있다는 것이다. 따라서 막연히 온도나 회석율, 혹은 균체 성장속도를 변화시키면서 기계적으로 최적 조건을 결정하려는 시도는 부분적으로 성공을 거둘 수 있을지는 모르나, 이들 조건이 상호간에 영향을 주기 때문에 만족할 만한 최적화는 불가능하다는 것이다. 다시 말하면 macro-event(즉 온도, pH, 회석율, 균체 성장속도, 배지 성분 변화 등)와 micro-event(즉 replication, transcription, translation, enzyme inhibition 등)의 상관관계를 잘 알고 있어야만 주어진 발효 공정을 효율적으로 최적화 할 수 있으며, 이는 biotechnology가 생화학, 미생물학, 분자생물학 및 생물화학공학 등 폭 넓은 분야의 복합적인 지식을 요구함을 뜻하는 것이라 하겠다.

참고 문헌

1. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., and Helling, R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3240-4344 (1974).
2. Ryu, D. D. Y. and Lee, S. B., In *Horizons of Biochemical Engineering*(Aiba, S. ed.), pp. 97-124, University of Tokyo Press(1987).
3. Immanaka, T., and Aiba, S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **369**, 1(1981).
4. Zabeau, M. and Stanley, K. K., *EMBO J.*, **1**, 1217 (1982).
5. Lee, S. B. *생물화학(한국화학공학회 간행)*, **1**, 5-18 (1987).
6. Remaut, R., Stanssens, P., and Fiers, W., *Gene*, **15**, 81(1981).
7. Park, S., Lee, S. B., and Ryu, D. D. Y., *Biotech. Bioeng.*, **36**(1991)
8. Noack, D., Müller, G., and Roth, M., *Z. Allg. Mikrobiol.*, **24**, 459(1984).
9. Roth, M., Naock, D., and Geuthur, R., *J. Basic. Micro-*

- biol.*, **25**, 265–271(1985).
10. Ollis, D. F., *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, **26**, 497 (1984).
 11. Siegel R. and Ryu, D. D. Y., *Biotech. Bioeng.*, **27**, 28 (1985).
 12. Kim, S. H. and Ryu, D. D. Y., *Biotech. Bioeng.*, **26**, 497(1984).
 13. Seo, J. H. and Bailey, J. E., *Biotech. Bioeng.*, **27**, 185 (1985).
 14. Lee, S. B., Ryu, D. D. Y., Siegel, R., and Park, S., *Biotech. Bioeng.*, **31**, 805–820(1988).
 15. Primrose, S. B., Derbyshire, P., Jones, I. M., Nugent, M., and Tagon, W., *Soc. Gen. Microbiol.*, **10**, 63–77 (1983).
 16. Summers, D. K. and Sharratt, D. J., *Cell*, **36**, 1097–1103(1984).
 17. Park, S., *Ph. D. Thesis*, University of California at Davis(1988).
 18. Siegel, R., *Ph. D. Thesis*, University of California at Davis(1985).
 19. Lee, S. B., Seressiotis, A., and Bailey, J. E., *Biotech. Bioeng.*, **33**, 1699(1989).
 20. Park, S., Ryu, D. D. Y., and Kim, J. Y., *Biotech. Bioeng.*, **36**, 493–505(1990).
 21. Park, S. and Ryu, D. D. Y., *Biotech. Bioeng.*, **35**, 287–295(1991).
 22. Ackers, G. K., Johnson, A. D., and Shea, M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 1129–1133(1982).
 23. Mandel, N. C. and Lieb, M., *Mol. gen. Genet.*, **146**, 299–302(1976).
 24. Lieb, M., *Mol. gen. Genet.*, **146**, 291–297(1976).
 25. Bailone, A., Leveine, A., and Devoret, R., *J. Mol. Biol.*, **131**, 553–572(1979).
 26. Ingraham, J., Maaloe, O., and Neidhardt, F. C., In *Growth of the Bacterial Cell*, Sinauer, Sunderland, MA (1983)
 27. Maloe, O. and Kjelgaard N. O., In *Control of Macromolecular Synthesis*, Benjamin, Elmsford, NY(1966).
 28. Old, R. W. and Primrose, S. B., In *Principles of Gene Manipulation* 3rd ed., Blackwell scientific Publication, Palo Alto, Ca, USA(1985).