

Bacillus licheniformis amylase(BLMA)의 생산성 향상을 위한 재조합 대장균의 배지 최적화

남승헌 · 이우종 · 변태강* · 서진호 · 박관화

서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구소
*건양대학교 식품공학과

Optimization of Growth Medium Composition for Overproduction of *Bacillus licheniformis* Amylase in Recombinant *Escherichia coli*

Seung-Hun Nam, Woo-Jong Lee, Tae-Gang Byun*
Jin-Ho Seo and Kwan Hwa Park

Department of Food Science and Technology and Research Center for New Biomaterials in Agriculture,
Seoul National University

*Department of Food Science and Technology, Keonyang University

Abstract

The research is concerned with optimization of growth medium composition in an attempt to improve the product yield of *Bacillus licheniformis* amylase (BLMA) in recombinant *E. coli* containing the BLMA gene. BLMA has the catalytic activity of producing branched oligosaccharides from starch. The medium optimization was performed in flask cultures based on the Box and Wilson method. The optimized medium is composed of tryptone 18.0 g/l, yeast extract 22.4 g/l, NaCl 5.3 g/l and glucose 2.1 g/l. In a jar fermenter culture with the conventional LB medium, the recombinant *E. coli* yielded 1.39 g/l of final dry cell mass and 5.11 U/ml of enzyme activity. In the optimized medium, however, the final cell mass was increased to 6.01 g/l and the enzyme activity to 23.2 U/ml. Medium optimization improved cell mass by 4.3 times and enzyme activity by 4.5 times. Such an increase in enzyme activity is mainly due to an enhancement of cell mass.

Key words: amylase, oligosaccharides, recombinant *E. coli*, optimization

서 론

올리고당은 최근 식품, 의약품 등의 분야에 폭넓게 이용되고 있다. 특히 분지올리고당은 낮은 점도와 높은 흡습성 등 물리화학적 성질이 우수하고 장내세균에 유용하며 충치예방에 효과가 있음이 보고되어 생물 신소재로 관심이 집중되고 있다. 따라서 분지올리고당의 생산과 이용기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻³⁾. 분지올리고당은 전분이나 pullulan으로부터 가수분해와 전이능력을 가진 amylase 효소에 의하여 생산된다. 본 논문에서 연구한 효소 *B. licheniformis* amylase(BLMA)는 *B. licheniformis*에서 발견한 amylase 계통의 효소로 가수분해 작용과 전이작용을 동시에 지닌 분지올리고당 생산효소이다^{4,5)}. BLMA 유전자로 형질전환된 재조합 대장균인 *E. coli* pJJ322의 발효공정 생산수율을 향상하기

위해 배지조성을 최적화하는 것이 본 연구의 목적이다.

배지 조성의 최적화 방법은 오랜 기간에 걸쳐 많은 연구가 수행되어 왔다. 그 중 대표적인 방법으로 Graeco-Latin square method⁶⁾, Box and Wilson method^{7,8)}, Rosenbrock's method⁹⁾, Orthogonal array method¹⁰⁾ 등이 있다. 각각의 방법마다 장점과 단점이 있으며 그 변형이 많이 있기 때문에 적용하는 실험의 성격과 원하는 결과에 따라 방법의 선택이 달라져야 할 것이다. 본 연구에 사용된 Box and Wilson method는 각 인자들이 정해진 상태에서 각 인자들의 농도를 달리하여 얻은 목표치와 각 인자들의 농도간의 관계를 고려하여 목표치가 높아지는 쪽으로 실험을 수행하기 때문에 각 인자들의 최적농도를 구할 수 있다. 이 방법은 배지 조성의 최적화를 위한 방법으로 많이 사용되고 있다. 그러나, 인자의 수가 많아지면 실험구의 수가 너무 많아져 결과해석이 어려워지는 것이 단점이다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 개선된 방법이 계속 발표되고 있는데, 주로 실험구를 줄이면서도 효과는 같거나 더 높아지는 방향으로 개량되고 있다. 그 방법에는 1/2 Box and Wil-

Corresponding author: Jin-Ho Seo, Department of Food Science and Technology and Research Center for New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University

son method, Rosenbrock's method 등이 있다^{17, 18}.

본 실험에서는 Box and Wilson 방법을 이용하여 재조합 대장균에서의 BLMA 생산 수율을 향상시키기 위해 배지조성의 최적화를 수행하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 서울대학교 식품공학과 효소공학실에서 개발한 *B. licheniformis* 유래의 amylase 유전자를 *E. coli* HB101에 형질전환시킨 재조합 *E. coli* HB101 : pIJ322이다. 형질전환을 위하여 사용한 plasmid pIJ322는 약 7.5 kb 정도이고 *Amp* 유전자를 선별표지로 갖고 있다^{4,5}.

배지 및 배양방법

E. coli 생육배지로는 LB배지를 기본 배지로 사용하였고 재조합 *E. coli* 생육배지로는 50 mg/l의 ampicillin이 첨가된 LB배지를 사용하였다. Box and Wilson method로 수행한 배지조성의 최적화시에는 yeast extract, tryptone, sodium chloride, 포도당 첨가농도를 각각 변화시켰다. 기본배지로 사용한 LB배지의 조성은 tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l이며, 0.2 M phosphate buffer를 사용하여 배양 중 pH변화를 억제하였다.

재조합 *E. coli* : pIJ322를 50 mg/l ampicillin을 함유한 LB배지에서 37°C, 200 rpm 조건으로 shaking incubator에서 10시간 전배양을 하였다. 플라스크 배양에서는 37°C로 예열된 500 ml baffled flask의 배양액 150 ml에 전배양액 2%(3 ml)를 접종한 후 37°C, 200 rpm 조건으로 12~18시간 배양하였다. 그리고 5 l 발효조(한국발효기)에서는 배양액 3 l에 전배양액 2%(60 ml)를 접종하여 37°C, 250~300 rpm, 2 vvm 조건으로 12~20시간 배양하였다.

분석방법

세포의 농도는 spectrophotometer(Hitachi U1100)를 이용하여 660 nm에서의 optical density를 측정하여 구하였다. 배양액 중의 포도당 농도는 Sigma glucose kit (No. 510)로 측정하였다. 효소의 역가 측정은 다음과 같이 행하였다. 배양액을 4°C에서 10,000×g로 10분간 원심분리하여 침전물을 모아 50 mM pH 7.5 Tris-HCl buffer로 현탁시켜 amplitude 60 μm로 총 3분간 sonication하였다. Ammonium sulfate fractionation과정을 거치고 투석한 다음 조효소액을 얻었다. 효소의 역가는 이 조효소액을 사용하여 β-cyclodextrin을 7 질로 50°C, pH 6.8 조건에서 측정하였다. 효소역가 1 unit는 1분간 1 μmole의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 하였다¹¹.

배지최적화

Box and Wilson method는 2단계로 구성되어 있다. 첫번째 단계로 인자(x_i)가 n 가지인 경우, 각 인자마다 일정량(w_i) 더하거나 빼주어 총 2^n 개의 실험을 수행하여 각각의 목표값(y_i)을 얻는다. 이 목표값(y_i)들의 평균값 b_0 와 각 인자들의 회귀계수(regression coefficient)인 b_i 로 각 인자(x_i)와 최종목표값(y)과의 관계식은 아래와 같이 표현된다.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n = b_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i \quad (1)$$

b_i 는 각 목표값(y_i)을 w_i 의 부호에 따라 가감해 줌으로써 얻을 수 있으며, 이와같은 방법으로 구한 회귀계수는 각 인자들이 목표값에 미친 영향정도를 나타낸다. 즉 이 b_i 값과 부호로서 각 인자들을 어떤 방향과 정도로 변화시키므로 배지최적화가 가능한지 예측할 수 있다. 두번째 단계로 목표값을 가장 높이는 조건을 찾기 위해 구체적인 실험을 수행할 때, 각 인자들이 적절한 방식으로 목표값에 영향을 미치도록 아래 식을 사용하여 a_i 를 결정하였다.

$$a_i = \frac{b_i w_i a_0}{b_0 w_0} \quad (2)$$

기준이 되는 a_0 와 w_0 값은 각 실험에 따라 적절히 선택하며, 이 때 지나치게 큰 값은 평가의 정확성을 위해 피하는 것이 좋다. 경험적으로 최소한 5개의 실험구가 각 해당농도 범위에 속하도록 a_0 , w_0 값을 결정하는 것이 바람직하다. a_i 값을 각 초기실험점에 더하거나 빼주어 두번째 실험을 설계하고, 실험을 수행하여 가장 목표치가 높은 실험구를 그 다음 set의 기준으로 삼는다. 이 2단계 실험 방법을 반복하면 목표함수를 최대화 하는 최적의 배지조성을 찾을 수 있다¹².

결과 및 고찰

재조합 대장균에서의 BLMA 발현 형태

LB배지에서의 재조합 대장균의 BLMA 발현형태를 알아보기 위하여 5 l 발효기(working volume 3 l)에서 배양하였다. 재조합 대장균의 최대비성장속도(μ_{max})는 0.81 hr⁻¹, 최종 균체농도는 1.39 g/l, 최종 BLMA 역가는 5.11 U/ml이었다(Fig. 1). BLMA의 발현은 균체농도에 비례하며, 효소의 비활성도(specific activity)는 배양 전 과정에 걸쳐 2.2~3.6 kU/g으로 거의 일정하게 유지되었다.

숙주세포로 사용한 *E. coli* HB101의 LB배지에서의 생육특성을 살펴본 결과, 비성장속도 0.86 hr⁻¹, 최종 균체농도 1.45 g/l이었다. 재조합균주에 비하여 비성장속도, 최종 균체농도가 모두 증가된 값을 보이는 것은, 재조합균주의 일부 대사에너지가 외부유전자의 발현에 사용되었기 때문으로 추정된다¹³.

Box and Wilson method에 의한 배지조성의 최적화 분지올리고당 생산효소인 BLMA효소의 생산수율을 높이기 위하여 배지 조성의 최적화 실험을 수행하였다. LB배지의 성분인 tryptone(x_1), yeast extract(x_2), sodium chloride(x_3), 포도당(x_4)의 정량적인 최적화를 Box and

Wilson method로 수행하였다. 본 논문에서는 목표함수(objective function)로 효소역가를 설정하고 각 단계에서 효소역가가 증가되는 방향으로 최적화를 수행하였다. 실험은 500 ml baffled flask에 150 ml 배양액을 넣고 shaking incubator에서 37°C, 200 rpm 조건으로 16시간 배양하였다.

첫번째 단계로 4가지 인자(x_i)에 각각 일정량(w_i) 더하거나 빼주어 총 16개의 실험구를 설계하였다. 이 실험 set에서 초기실험점을 tryptone 1%, yeast extract 1%, NaCl 1%, 포도당 0.4%로 설정했다. Table 1에 일단계 실험결과를 정리하였다. 각 실험에서 얻은 효소역가들이 y_i 이며, 효소역가의 평균값 b_0 는

$$b_0 = \frac{\sum y_i}{16} = 7.89$$

이다. 회귀계수(b_i)는 실험에서 얻은 효소역가 값을 각 인자들의 w_i 부호에 따라 가감하여 얻을 수 있었다. 따라서 각 인자(x_i)와 최종목표값(y)인 효소역가와의 관계식을 아래와 같이 구하였다.

$$y = 7.89 + 20.35x_1 + 22.55x_2 - 3.57x_3 - 7.56x_4$$

이 식에서 b_0 값이 그 set에서의 효소역가의 기준점이 되며, b_i 는 각 인자들이 목표값인 효소역가에 미치는 영향 정도를 나타낸다. 즉 배지최적화를 위하여 각 성분들의 농도를 어떤 방향과 정도로 변화시켜야 할 것인가를 각 인자들의 회귀계수의 부호와 값을 통해 판단할 수 있다. b_1 과 b_2 가 비교적 큰 양의 값을 가지므로 tryptone과

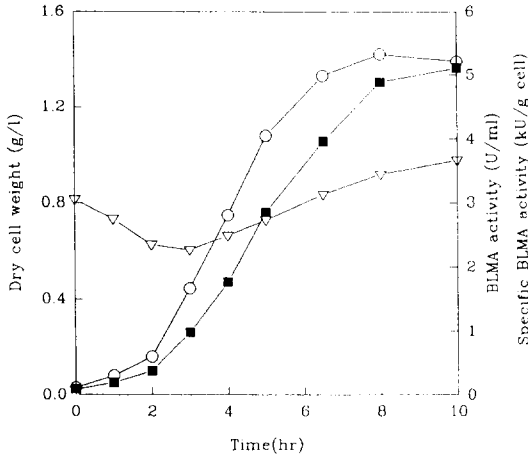


Fig. 1. Fermentation profiles of recombinant *E. coli* HB101: pIJ322 in the conventional LB medium with 50 mg/l ampicillin at 37°C. Medium composition includes tryptone 10 g/l, yeast extract 5 ml, NaCl 5 g/l and 0.2 M phosphate buffer

○—○; dry cell weight, ■—■; *Bacillus licheniformis* amylase activity, ▽—▽; specific enzyme activity

Table 1. Estimation of regression coefficients for maximization of enzyme activity in the LB medium

Exp. No.	Tryp. w_i	(x_1) %	Y.E. w_i	(x_2) %	NaCl w_i	(x_3) %	Glu. w_i	(x_4) %	Enz. Act. (U/ml)	DCW (g/l)	Sp. Act (kU/g)	End pH
1	+0.5	1.50	+0.5	1.50	+0.5	1.50	+0.2	0.06	9.65	3.95	2.44	6.77
2	+0.5	1.50	+0.5	1.50	+0.5	1.50	-0.2	0.02	17.23	4.49	3.84	7.67
3	+0.5	1.50	+0.5	1.50	-0.5	0.50	+0.2	0.06	7.59	3.62	2.10	7.03
4	+0.5	1.50	+0.5	1.50	-0.5	0.50	-0.2	0.02	18.26	4.48	4.95	7.85
5	+0.5	1.50	-0.5	0.50	+0.5	1.50	+0.2	0.06	5.97	2.76	2.16	6.43
6	+0.5	1.50	-0.5	0.50	+0.5	1.50	-0.2	0.02	6.66	2.29	2.91	7.14
7	+0.5	1.50	-0.5	0.50	-0.5	0.50	+0.2	0.06	4.76	2.43	1.96	6.36
8	+0.5	1.50	-0.5	0.50	-0.5	1.50	-0.2	0.02	9.48	2.37	4.00	7.34
9	-0.5	0.50	+0.5	1.50	+0.5	1.50	+0.2	0.06	4.08	2.76	1.48	5.99
10	-0.5	0.50	+0.5	1.50	+0.5	1.50	-0.2	0.02	9.73	2.76	3.53	7.39
11	-0.5	0.50	+0.5	1.50	-0.5	0.50	+0.2	0.06	5.05	2.47	2.04	6.07
12	-0.5	0.50	+0.5	1.50	-0.5	0.50	-0.2	0.02	10.21	3.06	3.34	7.58
13	-0.5	0.50	-0.5	0.50	+0.5	1.50	+0.2	0.06	2.91	1.49	1.95	5.90
14	-0.5	0.50	-0.5	0.50	+0.5	1.50	-0.2	0.02	3.35	1.26	2.66	6.90
15	-0.5	0.50	-0.5	0.50	-0.5	0.50	+0.2	0.06	4.24	1.45	2.92	6.04
16	-0.5	0.50	-0.5	0.50	-0.5	0.50	-0.2	0.02	3.23	1.28	2.52	6.98
bi		20.35		22.55		-3.57		-0.972				

$b_0 = 7.89$

$y = 7.89 + 20.35x_1 + 22.55x_2 - 3.57x_3 - 7.56x_4$

$a_0 = 0.1; a_1 = 0.13, a_2 = 0.14, a_3 = -0.02, a_4 = -0.05$

Table 2. Optimization of composition of LB medium based on the first set of experiments

Exp. No.	Tryp. x_1	Y.E. x_2	NaCl x_3	Glu. x_4	Enz. Act. (U/ml)	DCM (g/l)	Sp. Act. (kU/g)	End pH
1	0.87	0.86	1.02	0.45	6.90	2.34	2.95	6.75
2	1.00	1.00	1.00	0.40	9.40	2.68	3.15	7.14
3	1.13	1.14	0.98	0.35	11.58	2.89	4.01	7.47
4	1.26	1.28	0.96	0.30	14.45	3.37	4.29	7.84
5	1.39	1.42	0.94	0.25	16.71	3.95	4.23	8.01
6	1.52	1.56	0.92	0.20	15.90	4.46	3.57	8.13
7	1.65	1.70	0.90	0.15	15.58	4.47	3.49	8.36

Table 3. Estimation of regression coefficients for the second set of experiments

Exp. No.	Tryp. w_i	(x_1) %	Y.E. w_i	(x_2) %	NaCl w_i	(x_3) %	Glu. w_i	(x_4) %	Enz. Act. (U/ml)	DCW (g/l)	Sp. Act. (kU/g)	End pH
1	+0.4	1.79	+0.4	1.82	+0.4	1.34	+0.15	0.40	15.66	5.06	3.09	7.51
2	+0.4	1.79	+0.4	1.82	+0.4	1.34	-0.15	0.10	14.45	5.59	3.22	7.96
3	+0.4	1.79	+0.4	1.82	-0.4	0.54	+0.15	0.40	16.27	5.18	3.14	7.75
4	+0.4	1.79	+0.4	1.82	-0.4	0.54	-0.15	0.10	14.81	4.53	3.27	7.95
5	+0.4	1.79	-0.4	1.02	+0.4	1.34	+0.15	0.40	10.37	3.45	3.01	7.34
6	+0.4	1.79	-0.4	1.02	+0.4	1.34	-0.15	0.10	10.25	3.17	3.23	7.44
7	+0.4	1.79	-0.4	1.02	-0.4	0.54	+0.15	0.40	11.06	3.53	3.13	7.48
8	+0.4	1.79	-0.4	1.02	-0.4	0.54	-0.15	0.10	10.90	3.35	3.25	7.54
9	-0.4	0.99	+0.4	1.82	+0.4	1.34	+0.15	0.40	12.11	3.80	3.19	7.53
10	-0.4	0.99	+0.4	1.82	+0.4	1.34	-0.15	0.10	12.83	4.04	3.18	7.76
11	-0.4	0.99	+0.4	1.82	-0.4	0.54	+0.15	0.40	11.90	3.96	3.01	7.62
12	-0.4	0.99	+0.4	1.82	-0.4	0.54	-0.15	0.10	13.60	4.08	3.33	7.87
13	-0.4	0.99	-0.4	1.02	+0.4	1.34	+0.15	0.40	5.45	2.46	2.22	6.92
14	-0.4	0.99	-0.4	1.02	+0.4	1.34	-0.15	0.10	9.89	2.36	4.19	7.25
15	-0.4	0.99	-0.4	1.02	-0.4	0.54	+0.15	0.40	7.35	2.45	3.00	6.97
16	-0.4	0.99	-0.4	1.02	-0.4	0.54	-0.15	0.10	9.93	2.46	4.04	7.34
bi		8.28		14.58		-1.93		-0.972				

$b_0 = 11.68$

$y = 11.68 + 8.28x_1 + 14.58x_2 - 1.93x_3 - 0.972x_4$

$a_0 = 1.0; a_1 = 0.1, a_2 = 0.18, a_3 = -0.04, a_4 = -0.02$

Table 4. Optimization of composition of LB medium based on the second set of experiments

Exp. No.	Tryp. x_1	Y.E. x_2	NaCl x_3	Glu. x_4	Enz. Act. (U/ml)	DCM (g/l)	Sp. Act. (kU/g)	End pH
1	1.29	1.24	0.98	0.27	7.67	2.75	2.79	7.30
2	1.39	1.42	0.94	0.25	9.65	3.26	2.96	7.44
3	1.49	1.60	0.90	0.23	11.70	3.86	3.03	7.50
4	1.59	1.78	0.86	0.21	12.96	4.32	3.00	7.59
5	1.69	1.96	0.82	0.19	13.96	4.51	3.10	7.61
6	1.79	2.14	0.78	0.17	15.42	5.13	3.01	7.54
7	1.89	2.32	0.74	0.15	15.41	4.90	3.14	7.63

Table 5. Estimation of regression coefficients for the third set of experiments

Exp. No.	Tryp. w_i	(x_1) %	Y.E. w_i	(x_2) %	NaCl w_i	(x_3) %	Glu. w_i	(x_4) %	Enz. Act. (U/ml)	DCW (g/l)	Sp. Act. (kU/g)	End pH
1	+0.4	2.19	+0.4	2.54	+0.4	1.18	+0.1	0.27	17.88	5.70	3.14	7.76
2	+0.4	2.19	+0.4	2.54	+0.4	1.18	-0.1	0.07	15.84	4.55	3.50	7.90
3	+0.4	2.19	+0.4	2.54	-0.4	0.38	+0.1	0.27	17.03	5.91	2.88	7.79

Table 5. (Continued)

Exp. No.	Tryp. wi	(x ₁) %	Y.E. wi	(x ₂) %	NaCl wi	(x ₃) %	Glu. wi	(x ₄) %	Enz. Act. (U/ml)	DCW (g/l)	Sp. Act (kU/g)	End pH
4	+0.4	2.19	+0.4	2.54	-0.4	0.38	-0.1	0.07	16.43	4.85	3.39	8.01
5	+0.4	2.19	-0.4	1.74	+0.4	1.18	+0.1	0.27	15.82	5.31	2.98	7.60
6	+0.4	2.19	-0.4	1.74	+0.4	1.18	-0.1	0.07	14.37	3.69	3.63	7.69
7	+0.4	2.19	-0.4	1.74	-0.4	0.38	+0.1	0.27	17.03	5.01	3.40	7.80
8	+0.4	2.19	-0.4	1.74	-0.4	0.38	-0.1	0.07	15.66	3.99	3.92	7.75
9	+0.4	1.39	+0.4	2.54	+0.4	1.18	+0.1	0.27	17.07	5.80	2.94	7.58
10	-0.4	1.39	+0.4	2.54	+0.4	1.18	-0.1	0.07	15.46	4.42	3.50	7.66
11	-0.4	1.39	+0.4	2.54	-0.4	0.38	+0.1	0.27	16.99	5.54	3.07	7.65
12	-0.4	1.39	+0.4	2.54	-0.4	0.38	-0.1	0.07	16.18	4.67	3.46	7.80
13	-0.4	1.39	-0.4	1.74	+0.4	1.18	+0.1	0.27	13.84	4.17	3.32	7.49
14	-0.4	1.39	-0.4	1.74	+0.4	1.18	-0.1	0.07	3.51	1.26	3.77	7.63
15	-0.4	1.39	-0.4	1.74	-0.4	0.38	+0.1	0.27	3.94	1.45	4.56	7.66
16	-0.4	1.39	-0.4	1.74	-0.4	0.38	-0.1	0.07	3.64	1.28	5.16	7.75
bi		0.26		2.528		-4.97		0.757				

b₀ = 16.23

$$y = 16.23 + 0.26x_1 + 2.52x_2 - 4.97x_3 - 0.757x_4$$

a₀ = 1.0; a₁ = 0.003, a₂ = 0.05, a₃ = -0.126, a₄ = -0.022

Table 6. Optimization of composition of LB medium based on the third set of experiments

Exp. No.	Tryp. x ₁	Y.E. x ₂	NaCl x ₃	Glu. x ₄	Enz. Act. (U/ml)	DCM (g/l)	Sp. Act. (kU/g)	End pH
1	1.79	2.09	0.91	0.15	16.65	4.65	3.58	7.66
2	1.79	2.14	0.78	0.17	19.47	5.02	3.88	7.77
3	1.79	2.19	0.65	0.19	19.98	5.16	3.87	7.72
4	1.80	2.24	0.53	0.21	21.19	5.53	3.83	7.65
5	1.80	2.29	0.40	0.24	20.68	5.65	3.65	7.66
6	1.80	2.34	0.28	0.26	21.18	5.94	3.57	7.66

yeast extract 농도를 크게 증가시키는 방향으로, 그리고 b₃, b₄가 비교적 작은 음의 값을 가지므로 NaCl과 포도당 농도는 약간 감소시키는 방향으로 다음 단계 실험을 설계했다(Table 2). a₀를 0.1로 정하였을 때 각 a_i는 (2)식에 따라

$$a_1 = 0.13, a_2 = 0.14, a_3 = -0.02, a_4 = -0.05$$

값을 갖는다(재료 및 방법 참조). a_i값은 각 인자들마다 다른 w_i값을 고려하여 총괄적으로 각 인자들의 양이 효소역가에 미치는 영향을 나타낸다. 이 a_i값을 각 set의 기준이 되는 배지조성량(Table 2의 2번째 실험구)에 더하거나 빼주어 실험을 설계한다(Table 2의 3~7번째 실험구). 그리고 기준점 또는 근사값에서 최대효소역가를 갖는 경우도 예상할 수 있으며, 이 때 최대값을 확인하기 위하여 반대 방향으로 증감한 실험을 추가로 실시한다(Table 2의 1번째 실험구). 실험을 수행하여 효소역가가 가장 높은 5번째 실험구를 그 다음 실험 set의 기준으로 삼아 배지최적화를 계속 수행한다(Table 3, 4). 이와같이 2단계 실험과정을 반복 수행할수록 b₀값은 올라가고 b_i값의 차이, 즉 각 인자가 목표값인 효소역가에 미치는

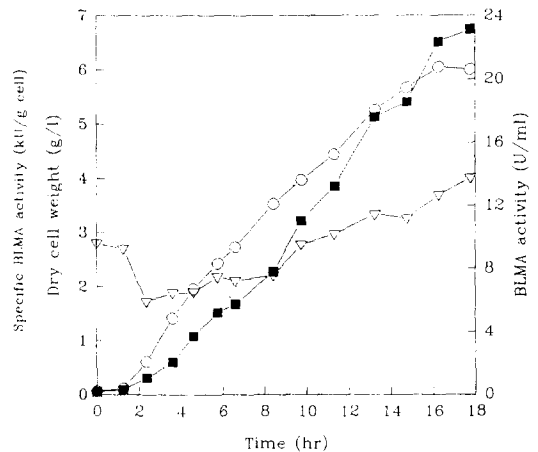


Fig. 2. Fermentation profiles of recombinant *E. coli* HB 101:plJ322 in the optimized medium with 50 mg/l ampicillin at 37°C. Medium composition includes tryptone 18 g/l, yeast extract 22.4 g/l, NaCl 5.3 g/l, glucose 2.1 g/l, and 0.2 M phosphate buffer.

○—○; dry cell weight, ■—■; *Bacillus licheniformis* amylase activity, ▽—▽; specific enzyme activity

영향이 0(zero)에 가까워진다(Table 3~5). Box and Wilson 방법으로 얻은 최적의 배지조성은 yeast extract 22.4 g/l, tryptone 18.0 g/l, NaCl 5.3 g/l, glucose 2.1 g/l이며, 이 배지에서 최종균체농도 5.53 g/l, 효소역가 21.2 U/ml의 값을 얻었다(Table 6의 4번째 실험구). 실험결과 중 특이한 것은 최종 배지 pH와 specific enzyme activity가 최적화가 될수록 한 set에서의 각 실험구끼리의 차이가 줄어들고 일정한 값으로 수렴됨과 동시에 배지의 최종 pH에 따라 specific enzyme activity가 달라짐을 알 수 있었다.

최적화된 배지로 5l 발효조에서 배양하였을 때 최종 균체농도 6.01 g/l, 효소역가 23.2 U/ml, specific enzyme activity 3.85 kU/g였다(Fig. 2). 같은 실험조건 하에서 기존의 LB배지로 실시한 실험 결과는 최종 균체 농도 1.39 g/l, 효소역가 5.11 U/ml이었다. 두 실험 결과를 비교하면 최적화된 배지에서는 기존 LB배지보다 최종균체농도가 4.3배, 효소역가는 4.5배 증가한 것이다. 두 배지 사이에 specific enzyme activity는 큰 차이를 보이지 않았고, 최적화배지에서의 효소역가 증가는 최종균체농도 향상에 기인한 것을 알 수 있다.

요 약

유전자 재조합 대장균에서 분지올리고당을 생산하는 *Bacillus licheniformis* amylase(BLMA)효소의 생산수율을 향상시키기 위하여 배지최적화 연구를 수행하였다. 기존 LB배지로 5l 발효조에서 배양한 결과 재조합 균주인 *E. coli* pIJ322의 최대비생육속도(μ_{max})는 0.81 hr⁻¹, 최종균체농도는 1.39 g/l, 최종효소역가는 5.11 U/ml였다. 배지조성 최적화는 Box and Wilson method에 의한 flask 배양실험으로 수행하였으며, 이 방법으로 결정된 배지 조성은 tryptone 18.0 g/l, yeast extract 22.4 g/l, NaCl 5.3 g/l, 포도당 2.1 g/l였다. 최적화된 배지로 발효조에서 *E. coli* pIJ322를 배양한 결과 최종균체농도 6.01 g/l, 최종효소역가 23.2 U/ml였다. 이것은 기존의 LB배지와 비교하여 최종균체농도 4.3배, 최종효소역가 4.5배 증가한 것이다. 최종효소역가의 증가는 균체농도가 향상되었기 때문인 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 지원에 의하여 수행되었습니다.

문 헌

- Hidemasa, H., Eida, T., Takizawa, T.: Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobac. Microflora*, 5, 37(1986)
- Kouhei, Y. and Tamura, Z.: Search for sugar source for selective increase of *Bifidobacteria*. *Bifidobac. Microflora*, 1, 39(1982)
- Glor, E.B., Miller, C.H. and Spandau, D.F.: Degradation of starch and its hydrolytic products by oral bacteria. *J. Dent. Res.*, 67, 75(1988)
- 김인철: *Bacillus licheniformis*의 내열성 α -amylase 및 maltogenic amylase 유전자의 분리와 그 효소 특성. 서울대학교 박사학위 논문 (1991)
- Kim, I.C., Cha, J.H., Kim, J.R., Jang, S.Y., Seo, B.C., Cheong, T.K., Lee, D.S., Choi, Y.D. and Park, K.H.: Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.*, 267(31), 22108 (1992)
- Gomes, J., Gomes, I., Esterbauer, H., Kreiner, W. and Steiner, W.: Production of cellulases by a wild strain of *Gliocladium virens*: optimization of the fermentation medium and partial characterization of enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 601(1989)
- Box, G.E.P. and Wilson, K.B.: *J. Roy. Stat. Soc., B*, 13, 1(1951)
- Schroder, K.D. and Weide, H.: Optimization of growth conditions for yeasts. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 4, 713 (1974)
- Votruba, J., Pilat, P. and Prokop, A.: Application of modified Rosenbrock's method for optimization of nutrient media used in microorganism culturing. *Biotech. Bioeng.*, 17, 1833(1975)
- Silveira, R.E., Toshihide, K., Susumu, T., Naomichi, N. and Shiro, N.: Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Methanosarcina barkeri*. *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 20(1991)
- 남승현: *Bacillus licheniformis* amylase(BLA)의 생산수율 향상을 위한 재조합 대장균의 배지최적화와 환경인자에 대한 연구. 서울대학교 석사학위 논문 (1993)
- Ruttloff, H., Huber, J., Zickler, F. and Mangold, K.-H.: Industrielle Enzyme. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, p.145(1979)
- Seo, Jin-Ho and Bailey, J.E.: Effect of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *E. coli*. *Biotech. Bioeng.*, 27, 1668(1985)

(1994년 4월 4일 접수)