

# 특집: 생물공정기술의 최적화(I-III)

## Aspergillus 산업용 균주개발과 응용

정 준 기

KIST 생명공학연구소 생물시험공장

### Filamentous fungi의 특징과 장점

Filamentous fungus(곰팡이균)는 지금까지 발효식품의 생산이나 식품제조시 필요한 공업용 효소 또는 항생제 생산에 아주 중요한 역할을 해오고 있다. 미생물을 이용한 물질생산에 있어서 주로 Wild type이나 또는 U.V 등 classical한 방법으로 생산균주 개발(auxotroph mutation) 통하여 많은 물질들을 생산해 내고 있다. 유전자 재조합 기술이 개발된 1980년 이후부터는 유전공학 기법을 이용하여 균주 개발을 시도해 왔으며, 이를 통한 효과적인 유전자 발현의 조절로 재조합 단백질 또는 효소들의 생산성을 향상시켰고 signalpeptide system을 이용하여 물질들의 세포막 밖으로 분비등을 성공적으로 향상시켰다. 또한 filamentous fungi는 공업용 효소의 높은 생산성과(27, 41) 자체내의 신진대사 물질 생산으로(3,15) 인하여 생물공학에 중요한 위치를 차지 하고 있다(표 1).

Filamentous fungi(균사형 곰팡이균)의 유전자 발현에 있어서 특징과 장점을 간추려 보면 다음과 같다.

첫째, yeast와 마찬가지로 자체내에 매우 효과적인 secretion system(분비체제)을 갖고 있으며(11), 둘째, Modification, capformation, glycosylation, 그리고 disulfide bridge formation 등이 이루어져 생산된 단백질이나 효소들의 안정성이 매우 높으며, 셋째, transformation으로(32,33,35) 인한 integration gene copy number의 증가로 gene amplification이(30) 쉽게 이루어져 물질의 생산성 증가와 재조합 단백질의 homogeneous와 hetero-

geneous한 발현이 용이하고(1,2,7,13,24,28,36,37) 넷째, 많은 filamentous fungi 균주들이 일반적으로 "GRAS"(generally regarded as safe)균주로 인정받아 인체에 해롭지 않아 별 어려움 없이 이용할 수 있고 다섯째, 실제적으로 대량생산에 필요한 fermentation에 대한 data가 많이 있다(45).

### 공업용 효소생산에서의 filamentous fungi의 중요성

실제로 공업용 효소나 재조합 단백질 생산에 있어서의 fungi는 아주 중요한 역할을 해 왔다. 공업용 효소는 식품 제조용 또는 응용 부분에 아주 폭 넓게 응용되고 있다. 또한 이러한 효소들은 여러 가지 형태와 활성도를 갖는 상태로 생산되고 있다. 일반적으로 80년 중반까지 효소 생산은 박테리아나 동·식물을 이용하여 이루어져 왔다. 그러나 발효기술의 발전과 대량생산을 위한 유전자 조작의 용이함으로 생산량과 그 다양성이 많이 향상되었다. 또 유전공학 기법은 박테리아와 효모 및 곰팡이균내의 효소생산과 효소응용 기술의 발전을 더욱 가속화시켰다. 박테리아는 성장속도가 빠르고 발효주기(cycle)가 짧은 것이 장점이며 세포막외로 분비가 이루어지지 않지만 효모와 fungi에서는 효소나 당단백질(Glycoprotein)들의 대량생산과 분비가 잘 이루어진다. 실제적으로 곰팡이균은 생산되는 효소들의 다양성으로 인하여 아주 폭넓게 이용되고 있다. Godfrey and Reichert의 1990년 보고서에 의하면 전세계적으로 27개 회사에서 260종류의 공업용 효소가 만들어지고 있으며 그중 97개가 fungi에서 66개가 박테리아, 23개가 식물에서, 25개가 동물에서, 9개가 yeast에서, 그리고 나머지 7개가 actinomycetes에서 만들어지고 있다.

American Type culture collection은 특히 가능한 효소가 있는 462개의 fungal culture를 제시하였다. 특히 그중 Aspergillus 종류가 가장 다양한 효소를 생산해 내고 있다. 97개의 효소중 61개가 Aspergillus, 특히 그중 70%가 Aspergillus niger에서 생산되고 있다. 동·식물 세포로부터 얻은 일단의 어떤 효소들은 독성 test를 만족시키지 못하는 경우가 많다. 그러나 곰팡이균에서 생산된 효소들은 아무런 해가 없어 인간에 바로 적용할 수가 있다. 표 2에 "GRAS" 형태로 전혀 인체에

표 1. Filamentous fungi와 주요 생산 물질

종류	생산 물질
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	beer, wine, ethanol, humanprotein, single cell protein
<i>Aspergillus</i> sp.	$\alpha$ -amylase, glucose oxidase, catalase, glucoamylase, protease, polygalacturonidase, citric acid, gluconic acid, oxalic acid 등
<i>Penicilium, Cephalosporium</i>	$\beta$ -lactam(항생제)
<i>Trichoderma</i> sp.	Cellulase

\*주로 많이 쓰이는 strain으로는 *A. niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. soja*, *A. awamori*, *Trichoderma reesi*, *Penicillium chrysogenum* 등이 있다.

표 2. Enzymes Permitted for Use in Food Products

strain	form	product
<i>Aspergillus niger</i>	GRAS	$\alpha$ -Amylase, Pectinase, Cellulase, Glucose Oxidase, Lactase, Lipase, Glucoamylase, Catalase
<i>A. oryzae</i>	GRAS	$\alpha$ -Amylase, Glucoamylase, Lactase, Lipase
<i>Rhizopus oryzae</i>	CFR	$\alpha$ -Amylase, Glucoamylase, Pectinase
<i>R. niveus</i>	CFR	Glucoamylase
<i>Mortierella vinaceae</i>	CFR	$\alpha$ -Galactosidase
<i>Endothia parasitica</i>	CFR	Rennet
<i>Mucor miehei</i>	CFR	Rennet
<i>M. pusillus</i>	GRASP	Rennet

Abbreviations : CFR, Code of the Federal Register; GRAS(generally regarded as safe), GRASP, GRAS petition.

해롭지 않은 것들이 나열되어 있으며 "GRAS"를 만족시키지 못하는 것들은 독성 test를 만족시켜야 한다.

Fungus의 expression vector 개발

전장에서 언급하였듯이 filamentous fungi는 박테리아나 효모에 비해 gene expression에 있어서 보다 많은 장점들을 갖고 있다. fungi expression system이 갖고 있는 이러한 장점에 비해 다른 expression system보다 발전속도가 늦은 이유는 fungi transformation 기술이 늦게 개발이 되었고 또한 transformation시 필요한 selectionmarker와 적절한 host cell들의 개발이 용이하지 않았기 때문이다. 하지만 현재는 selectionmarker와 host cell이 어느 정도 개발되어있어 재조합 단백질의 fungi내에서의 expression에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

재조합 단백질의 효과적인 expression을 위하여는 무엇보다도 훌륭한 expression vector가 개발되어야 한다. 이 expression vector내에는 *E. coli*에서의 자체 자생에 필요한 pro-caryotic element와(ampicillin resistance gene, replication 요소 등) foreign gen과 regulation element가 들어 있는 eucaryotic expression cassette가 함유되어있다.

재조합 Protein의 overexpression은 다음과 같은 방법을 통하여 이룰 수 있다.

1. 강한 promotor의 이용
2. Transformation에 의한 gene-amplification(gene copy수의 증가)
3. Signalpeptide를 이용한 세포막 외로의 secretion

강한 Promotor의 선정

재조합 protein의 overexpression을 위하여는 먼저 transcription level을 control하는 것이 가장 중요하며 이를 위하여 강한 promotor를 선정, 사용하여야 한다. 일반적으로 promotor는 어떤 물질(C-source나 순수한 O<sub>2</sub>)에 의하여 유도 또는 inducible promotor와 환경에 전혀 지배 받지 않는

표 3. *A. oryzae*  $\alpha$ -Amylase promotor의 essential elements

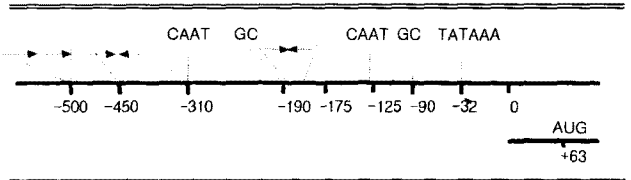
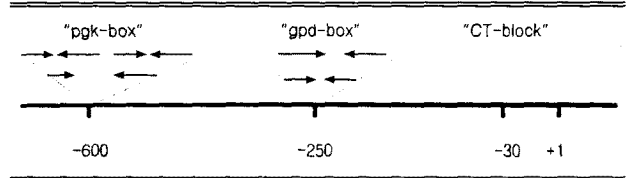


표 4. *A. nidulans* *gpd* promotor의 essential elements



constitutive promotor가 있다.

*Aspergillus* expression에서는 강한 inducible promotor로 *A. oryzae*의  $\alpha$ -amylase(39)나 glucoamylase가 주로 사용된다 (Van der Hondel, 1991, A. Lachmund, 1991). 또한 constitutive promotor로서는 glycolysis의 핵심 효소인 glycerolaldehyde-3'-phosphatedehydrogenase(*gpd*)와 pectinmethylesterase-promotor가 많이 이용된다. 그 중 *gpd*promotor는 constitutive 하기 때문에 발현유도 물질이 필요 없고 다른 독성의 물질을 만들어 내지않아 발현시키기에 아주 유용하다. 발현되는 protein이 cell에 영향을 주거나(독성) 불안정 할때는 inducible promotor를 사용하는 것이 좋다.

이 *A. oryzae*  $\alpha$ -amylase promotor에는 promotor essential element인 consensus sequence TATA-box, 그리고 CAAT-, GC-box, "direct-, inverted repeat-sequence" 등이 들어있다.

이 TATA-, CAAT-box는 *Aspergillus*의 glucoamylase와 Phosphoglycerinkinase에 존재하는것으로 나타났다(Gurr, S.J., 1987). 또한 GGGCGG-sequence로 나타나는 GC-box는 eucaryote에서 transcription factor인 SPI에 결합하는 것으로 나타났다(Wingender, E., 1988). 또한 expression이 강하게 일어나는 fungus에 소위 "CT-block"이 transcription startpoint 바로 앞에

표 5. *S. cerevisiae* MF  $\alpha$ -factor와 *A. oryzae*  $\alpha$ -amylase signal sequence의 비교

(Activity : unit/ml)

Promotor	Signal sequence	GOD <sub>ex</sub>	GOD <sub>in</sub>	GOD <sub>total</sub>	Secretion (%)
ADH 1	$\alpha$ -factor from <i>S. cerevisiae</i>	0.2	0.05	0.25	78
ADH 1	$\alpha$ -amylase from <i>A. oryzae</i>	1.2	0.1	1.3	95
GAL 10	$\alpha$ -factor from <i>Saccharomyces</i>	3.0	0.4	3.4	89
GAL 10	$\alpha$ -amylase from <i>A. oryzae</i>	8.7	1.6	10.3	84

존재하는 것으로 알려져 있다(Gurr, 1987). 그 예로 *A. nidulans*의 *gpd*-promotor에는 transcription startpoint 바로 앞에 "CT-Block"이 존재하는 한편 TATA-, CAAT-box가 결합되어 있다. 이 "CT-block"을 제거하였을 경우 promotor activity가 약 80% 줄어들고 transcription startpoint가 조금 밀리는 것으로 나타났다. 이 *gpd*-promotor내에 "pgk"와 "gpd"-box가 존재하는데 이 2 box내에는 "direct repeat sequence" 등 중요한 promotor element가 들어있어 *gpd* expression에 상당한 영향을 끼친다(punt, 1990). *A. nidulans*와 *A. niger*의 *gpd*-promotor를 비교해보면 둘다 "gpd-box"가 들어있고 이 promotor와 *lacZ*-Gene을 결합하여 expression을 시켜본 결과 "gpd-box"가 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

#### 재조합 protein의 secretion

많은 filamentous fungi(균사형 곰팡이)들은 유전자 발현 시 자체 내에 매우 효과적인 secretion system(분비 체제)을 갖고 있어 발현된 protein을 세포막 밖으로 훌륭하게 분비시킬 수 있다. 발현된 protein의 세포막 밖으로 효과적인 분비는 여러 가지 장점을 갖고있는데 첫째, 분비된 protein이 비교적 안정하고, 둘째, 세포막을 파쇄시킬 필요가 없기 때문에 분리 정제 시 yield를 높일 수가 있고, 셋째, 분리 정제 공정의 간소화로 생산가의 절감을 가져온다.

Protein은 일반적으로 N-terminal 말단 부분에 hydrophobic한 15~25 amino acid, 소위 signal sequence에 의해 secretion이 되며 이 signal sequence는 signalpeptidase에 의해 분해가 된다. 1983년 Heijne는 78개의 eucaryote signal sequence를 분석하여 "-3, -1"-rule을 제시하였는데 -1위치에는 Ala, Ser, Gly, Thr, Gln등이 들어있고 aromatic amino acid인 Phe, His, Tyr, Trp이나 전하를 띠고있는 Asp, Glu, Lys, Arg등이 없으며 -3위치에는 큰 극성의 Asn이나 Gln이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 1983년 perman과 Harvorson도 비슷한 분석 결과를 보고하여 위의 결과를 보충시켰다.

*Aspergillus*에서의 secretion은 일반적으로 extracellular protein의 signal sequence을 사용하는 것이 보다 더 효과적이다. 실제로 *A. niger*내의 glucose oxidase(GOD)의 over expression과 secretion을 위하여 *A. nidulans*와 *A. niger*의 *gpd*-promotor, 그리고 *A. oryzae*의  $\alpha$ -amylase signal sequence과 *A. niger*의 GOD-signalsequence(26)를 사용하였을 경우 GOD의

총 protein양은 wild type비해 7배정도의 향상을 가져왔고 wild type의 GODex가 0.3 unit/ml인 반면에 recombinant protein의 GODex는 약 150배정도 많은 48 unit/ml가 secretion이 되었고 50~70% 이상의 secretion효과를 가져올 수 있다. 또한 fungus의 promotor들은 단지 fungus에서만 사용할 수 있지만 이 signal sequence는 yeast에서도 훌륭한 역할을 하는 것으로 나타났다. 이 *A. oryzae*의  $\alpha$ -amylase signal sequence를 *Saccharomyces cerevisiae*에 접목하여 glucose oxidase를 발현시켜 본 결과 표 5에서 보는 바와 같이 *A. oryzae*  $\alpha$ -amylase signal sequence가 *Saccharomyces cerevisiae* 자체 내의 훌륭한 signal sequence인  $\alpha$ -factor signal sequence보다 발현 protein을 보다 더 효과적으로(약 3~4배) secretion시킴을 알 수 있었다. 또한 아래의 결과로 미루어 볼 때 signal sequence가 protein의 생산성에도 영향을 끼치는 것으로 추측된다.

일반적으로 분자량이 큰 단백질은 secretion이 효과적으로 잘 되지 않는 것으로 인식되고 있지만 분자량이 170 KDa인 GOD의 secretion이 잘 일어나는 것을 감안해 볼 때 secretion과 분자량의 크기와는 절대적인 함수관계가 성립된다고는 볼 수 없고 단지 분자량이 큰 단백질은 작은 단백질에 비해 secretion속도가 늦는 것으로 생각된다. 실제로 이 GOD의 expression은 24시간 내에 시작되지만 실제로 secretion된 단백질은 배양 후 3일이 지나서야 배양액 내에서 detection된다.

Filamentose fungi는 High-level protein secretion능력으로 재조합 단백질(효소, 의약품) 생산에 있어서 훌륭한 expression host로 인정받고 있는 실정이다. Fungi의 이러한 훌륭한 secretion 장점에도 불구하고 secretion process나 cellular mechanism에 관한 연구가 아직 미흡한 실정이다.

재조합 단백질의 secretion에 관하여 좀 더 자세히 이야기해 보기로 하자. 대부분의 분비 효소들은 glycoprotein이며 protein들의 합성이 시작되면 분비가 시작된다. Mammalian cell이 secondary mechanism을 갖고있는 반면에 fungi에는 없는 것으로 알려져 있다.

재조합 단백질의 secretion은 여러 가지 요소들에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있다. Fungi에서의 재조합 단백질의 secretion은 전적으로 hyphal tip growth에 의해 제어되는데 실제로 *A. niger*에서의 glucoamylase 발현 시 hyphal tip growth에 따라 secretion이 증가되는 것으로 나타났다(Woersten, H. A., 1991). 또한 specific organell의 축적, 특히 endoplasmic

reticulum 양이 증가함에 따라 secretion이 증가되는 것으로 나타났다. Vesicle activity에 의한 cell growth와 secretion과의 상관관계도 관찰이 되었다. 실제로 *Trichoderma reesei*에서의 invertase 발현 시 carbon catabolic-depressed strain는 긴 cisternae가 형성된 ER 양이 증가함에 따라 secretion이 증가되는 반면, wild type은 짧은 cisternae가 형성되고 secretion에 아무런 영향이 없는 것으로 나타났다. 또한 *Phanerochaete chrysosporium*에서도 이 같은 결과가 나타났는데 보다 많은 lipid substrate에서 배양 시 ER양이 증가됨에 따라서 secretion이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 vesicle activity가 secretion에 영향을 주는 경우는 filamentous fungi에 한 국한된 것은 아니고 mammalian cell의 신경세포에도 이미 이 process가 존재한다. Secretory vesicle이 microtubules와 결합하여 ATP-dependent process에 의해 이동한다. 이 현상은 cytoplasmic microtubules의 역할을 명백히 설명해 주는데 예를 들어 *Fusarium acuminatum*에서 MBC (methylbenzimidazole carbamate),  $\beta$ -tubulin inhibitor, 투입 시 hyphae의 형성이 줄어들고, 그 형태가 변하며 vesicles의 분배가 좀 더 단순해지기 때문에 secretion이 잘 일어나지 않는다. *A. nidulans*에서도 MBC가 함유된 fungicide 투입 시 hyphal apex에서 cytoplasmic microtubules가 상당 부분 손상이 되어 invertase의 secretion이 감소됨을 알 수 있다. 하지만 *Neurospora crassa*에서는 다른 effect를 나타낸다. 결론적으로 inhibitor 존재하여 fungi는 stress response를 나타낸다.

Vacuole도 secretion에 영향을 미치는 것으로 추측되는데 *Trichoderma reesei*에서 Bovine chymosin이 active form으로 분비 되는데 이것은 Prochymosin의 acid catalysis가 어떤 stage에서 일어나 vacuoles에 의해 periplasma membrane을 통해 hyphal tip에 전달되는 것으로 추측된다.

일반적으로 분비되기 전 모든 protein은 ER에서 시작하여 Golgi apparatus에 이르기까지 여러 과정을 거친다. 이 과정에서 secretion에 큰 영향을 끼치는 post-transcriptional modification이 이루어진다. Signal sequence와 propeptide sequence는 signalpeptidase에 의해 적절한 절단이 이루어져 protein 합성이 계속적으로 일어난다. 또한 disulphide bonds 형성 등 folding process로 인하여 분비 protein들이 안정하게 된다. ER로부터의 Protein의 효과적인 운송은 초기 protein의 정확한 합성과 folding에 달려있다. Unfolded protein들은 서로 불치어 secretion system을 방해하게 된다.

BiP나 PDI(protein disulphide isomerase) 등 effective folding에 영향을 주는 enzyme 등을 통해 protein modification을 이루어 secretion의 향상을 가져올 수 있다. BiP는 secretory protein이 ER를 통과하는데 도움을 주는 molecular chaperon의 역할을 하고 PDI는 protein내에 disulphide bonds의 형성을 이루게 한다. PDI는 mammalian cell이나 plant에는 충분한 양

이 존재하고 yeast에는 cellular protein의 약 0.005% 정도 존재한다.

당화(Glycosylation)도 secretion에 큰 역할을 하는 것으로 나타났다. 일반적으로 eucaryote에서는 Asp의 N부분에 주로 mannose가 붙고 Ser, Thr의 O에는 단지 mannose만 붙게되는데, filamentous fungi에서는 단지 N-glycosylation이 제한되는 것 외에는 대체적으로 연구data가 부족한 실정이다. 또한 dolichol phosphate나 surfactant(Tween80), membrane precursor인 cholin 등이 여러 fungi에서 enzyme secretion을 촉진시키는 것으로 나타났다. 결론적으로 O-linked glycosylation은 secretion에 필수적이고 N-linked glycosylation은 protein의 안정성과 pH나 온도 변화에 대한 안정에 필수적이다.

Cell wall porosity도 secretion에 영향을 주는 아주 중요한 요소 중의 하나이다. Invertase는 *Neurospora crassa*에서 periplasma space에 머무는 반면에 *A.niger*에서는 70%가 cell 내부에 있고 30%가 secretion되며, *A. nidulans*에서는 50%가 cell 내부에, 50%가 secretion된다.

많은 장점이 있음에도 불구하고 filamentous fungi에서의 recombinant protein expression에 아직도 많은 문제가 있는 것은 비록 정확한 amino acid sequence가 만들어 졌다고 하더라도 folding이 정확히 일어나지 않거나 glycosylation site가 정확치 않을 경우, 그리고 proteolytic cleavage가 제대로 일어나지 않을 경우가 있기 때문이다.

이러한 문제점을 해결한 Genencor사(Rochester, NY, USA)의 성공적인 사례를 들어보자. *A. niger* and *A. awamory*에서의 expression에 있어서 Bovine chymosin은 Aspergillopepsin A(extracellular aspartyl protease)에 의해 proteolytic degradation이 일어난다. Genencor사는 이러한 문제점을 conventional mutagenesis과 Aspergillopepsin A gene disruption을 통하여 해결하여 yield를 1 g/l 이상 성공적으로 이루어 낼 수 있었다.

### Transformation과 우량균주 selection

Fungi(*Aspergillus* sp)의 transformation 방법은 1983년 Tilburn(32)에 의해 개발되었다. 유전자조작을 통해 만들어진 expression vector를 host 균주에 transformation을 시킴으로 integration gene copy number의 증가로 인한 gene-amplification이 쉽게 이루어져 원하는 protein의 overexpression을 통해 보다 많은 protein의 생산을 기대할 수 있다. 또한 expression plasmide가 주로 chromosom DNA에 integration되기 때문에 재조합 단백질의 발현시 야기될 수 있는 plasmide의 stability에는 전혀 문제가 되지 않아 homogeneous나 heterogeneous한 단백질이나 효소들의 발현을 용이하게 시도할 수 있다.

### Transformation

*Aspergillus*의 transformation은 selection marker와 함께 cotransformation 방법으로 진행되며 다음과 같이 3단계로 구분할 수 있다.

첫째, protoplast의 형성, 둘째, protoplast의 분리와 purification, 셋째, PEG와 CaCl<sub>2</sub>를 이용한 expression vector와 selection marker의 protoplast내로의 transformation 등 3단계로 나눌 수가 있다.

*Aspergillus*의 일반적인 transformation 순서를 그림 1에 나타내었다.

**1. Spore suspension과 Protoplast 형성**

- (1) 3x CM-plate에 spore를 골고루 streaking한 후 37°C하에 2~3일 배양(검은 포자가 골고루 형성 되어야 함).
- (2) 10 ml 0.01% Tween 80으로 신선한 spore를 suspension 할 것.
- (3) Spore(3 plate)를 500 ml CD/0.025% (w/v) caseinhydrolysate에 접종한 후 2 liter Erlenmeyerflask에 (no baffle) 30°C, 150 rpm으로 15~18시간 배양.
- (4) Nylonfilter에 filtering한 후 1x 200 ml MP-buffer I으로 씻을 것.
- (5) 종이사이에 Mycelia를 압축 건조 시킨 후 무게 측정할 것(Yield 3 - 8g)
- (6) 1 g Mycelia당 5 ml MP-buffer II를 넣고 5 ml Gilson을 이용, 잘 suspension할 것.
- (7) 1 g Mycelia당 20 mg Novozym과 15,000 Unit Glucuronidase를 넣은 후 5분간 얼음에 incubation할 것.
- (8) 1 g Mycelia당 3 mg BSA를 넣은 후 30°C, 120 rpm으로 2~3시간 배양. 매 30분 마다 현미경으로 관찰(mycelia의 외벽이 digestion이 되어 mycelia가 거의 없어지면 Protoplast 형성이 완료)

**2. Sorbitol gradient(Isolation and purification of protoplast)**

- (1) Protoplast를 30 ml Corex-glas에 옮긴 후 동량의 ST-buffer I을 상층에 Corex-glas벽을 이용, 조심히 넣을 것.
- (2) HB4-rotor에 25°C, 6000 rpm으로 10분간 centrifugation 할 것(! no brake !!)
- (3) 층 경계면에 생긴 Protoplast(거의 허연색)를 구부러진 Pasteurpipette를 이용, 뽑아낸다.
- (4) 새 Corex-glas에 옮긴 후 10 ml ST-buffer II로 잘 suspension할 것.
- (5) 10분간, 4000 rpm으로 centrifugation(! with brake !!)
- (6) 5번과 동일하게 2x 10 ml STC-buffer로 세척(매 10분간 centrifugation할 것.)
- (7) 2번째 세척 centrifugation시 protoplast수를 셀것(Cytometer를 이용).

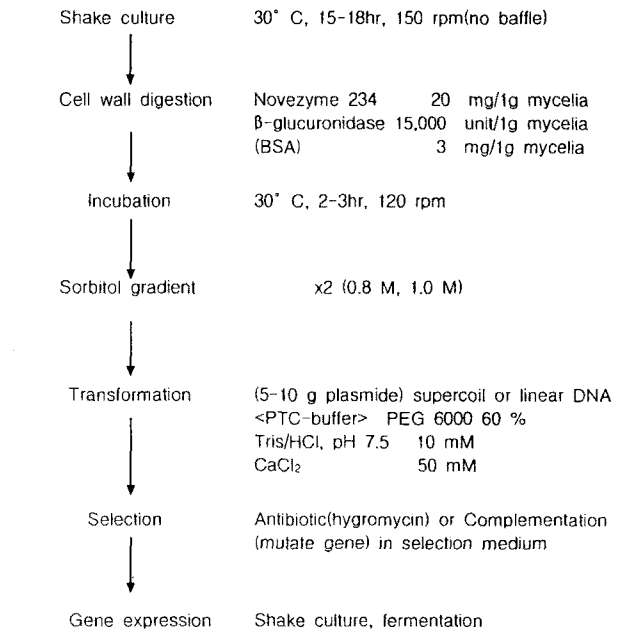


그림 1. *Aspergillus*의 transformation step.

- (8) 2번 centrifugation후 STC-buffer로 suspension할 것.
- (9) Protoplast의 농도를 1~5x10<sup>7</sup>/200로 맞출 것 (-80°C에 보관 가능).

**3. Transformation**

- (1) Expressionvector와 selectionplasmide 10 µg을 10 µl H<sub>2</sub>O에 잘 섞은 후
- (2) 200 µl Protoplast에 넣고 5분간 상온하에 incubation할 것.
- (3) 50 µl PTC-buffer를 첨가한 후 20 분간 상온하에 incubation할 것.
- (4) 750 µl PTC-buffer를 첨가한 후 20 분간 상온하에 incubation할 것.
- (5) 5분간 centrifuge할 것(Microcentrifuge).
- (6) 1 ml STC-buffer로 세척후 200 µl로 suspension할 것.
- (7) 각 Transformationprobe를 3 ml Toplayer로 각 selectionplate(100 µg HgyB 첨가)에 골고루 배분할 것. (DNA없는 probe는 regenerationplate에 희석(10<sup>3</sup>-10<sup>7</sup>)
- (8) 3~5일간 37°C로 incubation할 것(Regenerationplate는 2일후 수를 셀 것).
- (9) 각 Transformant를 안정한 개대를 얻기 위해 CD/HgyB-plate에 2~3x streaking할 것.

MP-buffer I: 0.6 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O  
10 mM Kalium phosphate buffer, pH 5.8

MP-buffer II:	1.5 M	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
	10 mM	Kalium phosphate buffer, pH 5.8
Kalium phosphate buffer:	100 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
(pH 5.8)	100 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 에 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O로 pH 5.8를 적정
ST-buffer I:	0.6 M	Sorbitol
	0.1 M	Tris/HCl, pH 7.5
ST-buffer II:	1 M	Sorbitol
	10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
STC-buffer:	1 M	Sorbitol
	10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	50 mM	CaCl <sub>2</sub>
PTC-buffer:	60%	Polyethyenglycol 6000
	10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	50 mM	CaCl <sub>2</sub>
Regeneration plate		: CD-Medium+1M Saccharose (osmotiging)
Selection plate		: Regeneration plate+100 g/ml Hygromycin B
Top layer for Regeneration plate		: Regeneration plate+0.25% Agar
Top layer for Selection plate		: Selection plate+0.25% Agar

## Selection

Host cell에 transformation이 이루어진 후 transformant의 선별은 selectionmarker를 이용한 2가지 방법이 이용되고 있다.

### 1. Antibiotic selection

Antibiotic으로는 주로 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 만들어지는 aminoglycoside antibiotic인 Hygromycin B(hygB)가 사용되는데 이 hygB는 ribosome내의 peptidyl-tRNA에 삽입되어 pp-tRNA.mRNA의 translocation을 방해하여 translation을 inhibition한다. Selection marker으로는 pAN7-1를 사용하는데 이 pAN7-1에는 *E. coli*의 Hygromycin B-Phosphotransferase gene이 들어있고 phosphorylation을 통하여 hygB를 inactivation시킴으로 cotransformation시 이 selection marker가 들어간 transformant만이 hygB-selection 배지에서 자라고 wildtype는 자라지 않아 용이하게 올바른 transformant를 selection할 수 있다. 이 방법은 주로 *A. niger*에서 이용되는데 hygB 농도 100 µg/ml이하에서 transformant를 쉽게 selection할 수 있다. *A. oryzae*와 *A. nidulans*에서는 hygB 농도 1000 µg/ml에서나 가능하기 때문에 경제상 사용하기 어렵고 단지 complementation방법으로 selection이 이루어진다.

표 6. *Aspergillus*의 host cell과 selection marker

Mutant host cell	Selection marker	Auxotroph medium
<i>A. oryzae</i> AO4.1( <i>pyrG1</i> , pAO4-2(10 kbp, amp <sup>r</sup> ) <i>nia14</i> )		Uridin
<i>A. nidulans</i> G191	p19. <i>pyrG</i> (5.1 kbp, amp <sup>r</sup> )	Uridin
<i>A. nidulans</i> G191	pDJB2( <i>pyr4</i> -gene, amp <sup>r</sup> )	Uridin

### 2. Complementation

이 Complementation 방법으로 transformant를 selection하기 위해서는 첫째, mutant host cell과 둘째, transformation후 chromosome DNA에 integration되어 이 mutant gene을 다시 repair할 수 있는 selection marker등, 2가지 선제 조건이 선행되어야 한다. 그러나 현재까지 mutant host cell과 selection marker들이 많이 개발되어 있는 것이 많지않아 이 방법을 이용하기에는 많은 제약 조건들이 따른다. 표 6에 필자가 주로 사용했던 몇 가지 complementation방법들을 나열해 보았다.

### 3. Type of integration

Yeast나 fungi에서의 transformation시 expression vector의 chromosome DNA에 integration되는 형태는 주로 3가지로 나타난다(7, 12, 35).

- (1) Integration type I(homologous single copy integration)  
Expression vector가 chromosome gene에 single crossing over로 homologe integration되는 경우이다. 이 type은 주로 promotor를 test할 때 많이 원하는 형태이며 transformation시 supercoil 보다는 linear DNA 사용 시 이 형태로 integration이 될 확률이 상당히 높다 (transformant의 60 %이상).
- (2) Integration type II(hetelogenous random integration)  
Expression vector가 chromosome DNA의 한곳에 integration 되는 것이 아니라 여러 곳에 integration되는 형태로 일반적으로 많이 일어나는 형태이다. 이 random integration으로 인하여 주로 over expression이 일어난다(7).
- (3) Integration type III(Gene replacement)  
Complementation 방법 시 주로 요구되는 형태로 Expression vector의 homologous geneomic DNA integration시 double crossing-over으로 인하여 host cell 과 insert DNA가 서로 교체되어 gene replacement가 일어난다.

## Fungi에서의 gene expression과 산업적 응용

Protein의 대량생산에 있어서 classic한 생산방법(UV-mutation)에는 생산량의 한계가 있기 때문에 지금은 거의 유전자

표 7. *Aspergillus*에서의 생산 물질

물질	생산 균주	특징
IL-6(1)	<i>A. nidulans</i> (carriz, et. al. 1990)	no glycosylation
Glucose oxidase	<i>A. niger</i> N400 (witteven, et. al. 1990)	7.6 mg/protein
	<i>A. niger</i> B60 (whittington, et. al. 1990)	2.5 unit/mg
	<i>A. niger</i> NRRL3 (Jung, et. al. 1994)	0.9 g/l
	<i>A. niger</i> (christensen, et. al. 1988)	12 g/l
<i>Rhizomucor miehei</i> Aspartic proteinase(2)	<i>A. oryzae</i> (Paulin P. Ward, et. al. 1992)	200 배
Pectin methylesterase(15)	<i>A. niger</i> (khaph, et. al. 1992)	16 multycopy
<i>E. coli</i> Aspartase(49)	<i>A. nidulans</i>	25 mg/l
Lactoferrin(47)	<i>A. oryzae</i> (Paulin P. Ward, et. al. 1992)	2 g/l
Phytase(50)	<i>A. oryzae</i> (Paulin P. Ward, et. al. 1992)	3.3 배
	<i>A. niger</i> (Marisa K. Chelius, et. al. 1994)	

조작을 통한 recombinant-DNA 방법을 이용하여, 즉 여러 가지 promotor와 terminator, structure gene의 합성을 통하여 항생제나 여러 가지 효소의 생산성의 향상을 가져올 수 있다. 특히 fungus내에는 1,000개 이상의 gene(유전자)이 있고 그 중 특히 상당히 강한 promotor를 갖고있는 gene들이 많이 존재하고있다. 예를 들면 전분 분해 효소인  $\alpha$ -amylase-promotor, 또는 glycolyse의 중심 효소인 glycerolphosphate-3'-dehydrogenase-promotor등 transcription에 상당히 많은 영향을 끼치는 promotor들을 이용하여 많은 protein의 생산성 효과를 갖고 올 수 있다. 또한 fungus의 transformation기술의 향상으로 fungus를 이용한 다른 여러 가지 protein의 expression이 (heterogeneous expression) 용이하게 되었고 그로 인해 많은 생산성의 효과를 가져왔다. 특히 인체의 암세포 억제제인 Interleukin-6이라든지 항생제인 *penicillium*내의  $\beta$ -lactam 등은 많은 효과를 가져왔다.

앞에서 언급했듯이 fungi는 다른 것에 비해 아주 효과적인 secretion system을 갖고있다. Yeast에서는 대부분 overglycosylation이 일어나는 반면에 fungi에서의 발현의 특징은 glycosylation이 정확히 일어난다는 것이다. 실제적으로 GOD가 *S. cerevisiae*에서 발현 되었을 때 분자량이 2배 정도 늘어날 정도로 overglycosylation이 일어난 반면, IL-6의 *A. nidulans*내에서 발현을 보면 glycosylation이 전혀 일어나지 않은 것을 볼 수 있었다. 또한 이러한 유전공학 기법을 이용한 균주 개발 이외에 발현과 배지 조건, 그리고 발효 조건의 최적화로 생산성 효과를 높일 수가 있다. 특히 filamentous fungi배양시 spore를 형성하는 모든 균주들에게서 볼 수 있는 cell wall growth가 일어난다. 이러한 것을 줄이기 위해 처음에는 교반속도를 200 rpm정도 낮게 시작하여 교반해 주는 것이 좋다. 또한 *A. niger*에서는 pH 2~3에서 citric acid, pH 5~8에서 gluconic acid, 그리고 pH 8 이상에서는 oxalic acid 등 많은 산들이 만들어 지는데 산에 민감한 물질들을 만들기 원할 때는 필히 최적의 pH값을 구한 후 이 조건하에서 배양을 하여야 한다. GOD의 실제적인 예를 들어보겠다. *A. niger* 재조합 균주

들을 GOD정성분석 test(agarplate-test)를 통하여 몇 개의 우량 균주를 선별한 후 shake culture를 통한 GOD정량분석을 하여 가장 우수한 재조합 균주를 선별하였다. 이 GOD는 pH 3 이하에서는 degradation이 일어나므로 먼저 여러 가지 buffer system을 이용하여 발효와 GOD-activity의 최적 pH(4.5~5.5)를 선택하였다. 이 최적의 pH가에서의 배양시 wild type보다 2배의 GOD expression을 가져 올 수 있었고 또한 최적의 발효 조건하에서 배지의 optimization(Hinnenberg배지)을 통하여 4배의 생산성 효과를 가져올 수 있었고 protein gel을 통하여 glycosylation이 정확히 일어난 것을 알 수 있었다.

표 7에 fungi에서 생산되는 의약품이나 효소들에 대해 간략히 기술해 보았다.

이 fungi expression system을 이용 1990년부터 재조합 단백질 생산에 많은 연구와 투자를 하고 있으며 훌륭한 연구 결과가 많이 나타나 산업화에 응용되고 있는 실정이다.

## 참고문헌

- Carrez, D., Janssens, W., Degrave, P., van den Hondel, C. A. M. J. J., Kinghorn, J. R., Fiers, W. and Contreras, R. (1990). Heterologous gene expression by filamentous fungi: secretion of human interleukin-6 by *Aspergillus nidulans*. *Gene* **94**, 147-154.
- Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S.B., Hjortshoej, K., Thim, L. and Hansen, M.T.(1988). High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* **6**, 1419-1422.
- Cullen, D., Gray, G. L., Wilson, L. J., Hayenga, K. J., Lam-sa, M. H., Rey, M. W., Norton, S. and Berka, R. M. (1987). Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 369-376.
- De Baetselier, A., Vasavada, A., Dohet, P., Ha-Thi, V., De Beukelaer, M.,Ercicum, T., De Clerck, L., Hanotier, J. und Rosenberg, S. (1991). Fermentation of a Yeast producing *A. niger* Glucose Oxidase: Scale-Up, Purification and characterization of the rekombinant Enzyme. *Bio/Technology* **9**,

- 559-561.
5. De Ruiter-Jacobs, Y. M. J. T., Broekhuijsen, M., Unkles, S. E., Campell, E. I., Kinghorn, J. R., Ontreñas, R., Pouwels, P. H. and van den Hondel, C. A. M. J. J. (1989). A gene transfer system based on the homologous *pyrG* gene and efficient expression of bacterial genes in *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **16**, 159-163.
  6. Duke, F. R., Weibel, M., Page, D. S., Bulgrin, V. G. and Luthy, J. (1969). The Glucose Oxidase Mechanism. Enzyme Activation by Substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 3904-3990.
  7. Fincham, J. R. S. (1989). Transformation in fungi. *American Society for Microbiol.* **3**, 148-170.
  8. Frederick, K. R., Tung, J., Emerick, R. S., Masiarz, F. R., Chamberlain, S. H., Vasavada, A., Rosenberg, S., Chakraborty, S., Schopfer, L. M. and Massey, V. (1990). Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* **265**, 3793-3802.
  9. Gonzalez, A., Jimenez, A., Vasquez, D., Davies, J.E. and Schindler, D. (1978). Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **521**, 459-469.
  10. Gritz, L. and Davies, J. (1983). Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**, 179-188.
  11. Gwynne, D. I., Buxton, F. P., Williams, S. A., Garven, S. and Davies, R. W. (1987). Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*.
  12. Hinnen, W., Hicks, J. B. and Fink, G. R. (1978). Transformation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933.
  13. Jeenes, D. J., Mackenzie, D. A., Roberts, I. N. and Archer, D. B. (1991). Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotech.*
  14. Kaster, K. R., Burgett, S. G. and Ingolia, T. D. (1984). Hygromycin B resistance as dominant selectable marker in yeast. *Current Genetics* **8**, 353-358.
  15. Khanh, N. Q., Leidinger, K., Albrecht, H., Rutkowski, E. and Gottschalk, M. (1992). Effects of Promoters on the Enhancement of pectin methyl Esterase expression in *Aspergillus niger*. *Bio/Technology* **14**, 1047-1052.
  16. Kriechbaum, M., Heilmann, H. J., Wientjes, F. J., Hahn, M., Jany, K. D., Gassen, H. G., Sharif, F. and Alaeddinoglu, G. (1989). Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL3. *FEBS-Letters*, **225**, 63-66.
  17. Kusai, K., Sekuzu, I., Hagihara, B., Okunuki, K., Yamacuchi, S. and Nakai, M. (1960). Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Biochim. Biophys. Acta.* **40**, 555-557.
  18. Mueller, D. (1928). Study for the new Enzyme: Glucose oxidase. *Biochem. J.* **199**, 36-170.
  19. Nakamura, S. and Sumiko, F. (1968). Comparative Studies on the Glucose Oxidase of *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense*. *J. Biochem.* **63**, 1968.
  20. Pazur, J. H. and Kleppe, K. (1964). The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* **3**, 578-583.
  21. Pazur, J. H., Kleppe, K. and Cepure, A. (1965). A Glycoprotein Structure for Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 351-357.
  22. Pazur, J.H. (1966). Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. In: Wood, W.A. (ed). *Methods in enzymology*. Vol. **9**, Academic Press, New York, London, 82-86.
  23. Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H. and van den Hondel, C. A. M. J. J. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 117-124.
  24. Rambosek, J. and Leach, J. (1987). Recombinant DNA in filamentous fungi. Progress and prospects. *CRC.* **6**, 357-393.
  25. Reiss, J. (1966). Untersuchung zum cytochemischen Nachweis von Glucose oxidase E.C. 1.1.3.4 bei *Aspergillus niger*. *Histochemie* **7**, 202-210.
  26. Rogalski, J., Fiedurek, J., Szczordrak, J., Kapusta, K. and Leonowicz, A. (1988). Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 508-511.
  27. Rutkowski, E. and Khanh, N. Q. (1991). Filamentous fungi as Expressionssysteme for the industrial Enzyme. *GIT Fachz. Lab.* **12**, 1309-1315.
  28. Saanders, G., Picknett, T. M., Tuite, M. F. and Ward, M. (1989). Heterologous gene expression in filamentous fungi. *TIBTECH* **7**, 283-287.
  29. Sols, A. and de la Fuente, G. (1957). On the substrate specificity of Glucose Oxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **24**, 2067.
  30. Swart, K., van de Vondervoort, P. J. I., Witteveen, C. F. B. and Visser, J. (1990). Genetic localization of a series of genes affecting glucose oxidase levels in *Aspergillus niger*. *Current Genetics* **18**, 435-439.
  31. Swoboda, B. E. P. (1968). The Relation between molecular conformation and the binding of Flavin-Adenin dinucleotide in Glucose Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 365-379.
  32. Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A. and Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-221.
  33. Timberlake, W. E. and Marschall, M. A. (1989). Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* **244**, 1313-1317.
  34. Tsuge, H., Natsuaki, O. and Ohashi, K. (1975). Purification, Properties and Molecular Features of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.* **78**, 835-843.
  35. Turner, G. and Ballance, D. J. (1985). Cloning and



- transforming in *Aspergillus*. In: Gene Manipulations in Fungi. Bennett, J. W., Lasure, L. L.(eds) Orlando, Academic Press, 259-292.
36. Upshall, A., Kumar, A. A., Bailey, M. C., Parker, M. D., Favreau, M. A., Lewison, K. P., Joseph, M. L., Maraganore, J. M. and McKnight, G. L. (1987). Secretion of active human tissue plasminogen activator from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 1301-1304.
  37. van den Hondel, C. A. M. J. J., Punt, P. J. and van Gorcom, R. F. M. (1991). Heterologous gene expression in filamentous fungi. In: More gene manipulations in fungi. Bennett, J. W., Lasure, L. L. (ed). San Diego, Academic Press, 396-428.
  38. van Dijken, J. P. and Veenhuis, M. (1980). Cytochemical Localization of Glucose Oxidase in Peroxisomes of *Aspergillus niger*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 275-283.
  39. K. Hellmuth, S. Pluschkell, J. K. Jung, U. Rinas(1995). Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* using genetic- and process-engineering techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnology* **43**, 978-984.
  40. Wirsal, S., Kriebbaum, M., Koopmann, J. O., Heilmann, H. J. and Gassen, H. G. (1990). Glucose Oxidase of *Aspergillus niger*: Characterization of the structural gene and comparison of the expression in wild type and transformed *Aspergillus strains*. Dechema Biotechnology Conferences 4 - VCH Verlagsgesellschaft 1990.
  41. Witteveen, C. F., van de Vondervoort, P., Swart, K. and Visser, J. (1990). Glucose Oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 683-686.
  42. Witteveen, C. F., Veenhuis, M. and Visser, J. (1992). Localization of Glucose Oxidase and Catalase Activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbio.* **58**, 1190-1194.
  43. Wittington, H., Kerry-Williams, S., Bidgood, K., Dods-worth, N., Pederdy, J., Dobson, M., Hinchliffe, E. and Ballance, D. J. (1990). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*, *A. nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **18**, 531-536.
  44. Yoshimura, T. and Isemura, T. (1970). Subunit Structure of Glucose Oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *J. Biochem.* **69**, 839-846.
  45. Zetelaki, K. Z. (1970). The Role of Aeration and Agitation in the Production of Glucose Oxidase in Submerged Culture. II. *Biotech. Bioeng.* **12**, 379-397.
  46. Steven J. Rothstein, Kristine N. Lahners, Colin M. Lazarus, David C. Baulcoumbe and Anthony A. Gatenby(1987). Synthesis and secretion of wheat  $\alpha$ -Amylase in *saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, **55**, 353-356
  47. Paulin P. Ward, Jing-Y. Lo, Orla M. Conneely (1992). Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology*, **10**, 784-789.
  48. Paulin P. Ward, Christopher S. Piddington, Orla M. Conneely (1995). A System for production of commercial quantities of human lactoferrin: A broad spectrum natural antibiotic. *Bio/Technology*, **13**, 498-503.
  49. Gary D. Hunter, Christopher R. Baily, Herbert N. Arst, Jr. (1992). Expression of a bacterial aspartase gene in *Aspergillus nidulans*: an efficient system for selecting multicopy transformants. *Current Genetics* **22**, 377-383.
  50. Marisa K. Chelius, Rudy J. Wodzinski(1994). Strain improvement of *Aspergillus niger* for phytase production: *Appl Microbiol Biotechnol.* **41**, 79-83.