

대장균에서 lactose를 이용한 수용성 재조합 인간 상피 세포 성장 인자의 생산

박세철 · 권태종¹ · 고인영 · 유광현*

(주)유한양행 중앙연구소, ¹건국대학교 미생물공학과

Efficient Use of Lactose for Production of the Soluble Recombinant Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*. Park, Se-Cheol, Tae-Jong Kwon¹, In-Young Ko, and Kwang-Hyun You*. Lab. of Biotechnology, Yuhan Research Center, Yuhan Corporation, Kunpo-si 435-030, Korea, ¹Department of Microbial Engineering, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea - Recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) was produced by *E. coli* BL21 (DE3) harboring a plasmid pYHB101. The production of rhEGF was 44.5 mg/L when the *E. coli* BL21 (pYHB101) was cultured at 27°C for 48 hr in the modified MBL medium containing 10 µg/L glucose with 10 µM IPTG/lactose induction at 2 hr after inoculation. It was shown that lactose is able to induce the rhEGF expression of *E. coli* BL21 (pYHB101) with the same efficiency as IPTG. In the batch culture system, when induced with 10 µM lactose, *E. coli* BL21 (pYHB101) produced maximum 45 mg/L of the rhEGF at 28 hr culture in the modified MBL medium containing 10 g/L glucose. In the semi-fed batch culture system, the volumetric yield was 160 mg/L when the culture was added with 0.5% (w/v) lactose and 0.25% (w/v) yeast extract in the late logarithmic phase and 94.3% of rhEGF was secreted as soluble form. However, when the culture was added with them in the early logarithmic phase, the volumetric yield was 120 mg/L and 20.9% of rhEGF was found in cytoplasmic insoluble aggregates. It was found that the addition time of lactose was important for production of soluble rhEGF from *E. coli* BL21 (pYHB101).

Key words: soluble recombinant human epidermal growth factor, pYHB101, lactose, fed-batch culture

hEGF(human epidermal growth factor)는 사람의 노 중에서 처음으로 확인되었으며 상처 및 궤양 치료, 간 세포의 재생 및 증식 작용 등의 생리적 작용을 기초로 하여 세포 생물학 분야에서 주목받는 성장 인자의 하나가 되었다[3]. 이러한 생물학적, 약리학적 중요성에도 불구하고 사람의 노 등으로부터 얻을 수 있는 양은 한정되어 있으므로 hEGF를 유전자 재조합 기술에 의해 대량생산 하려는 연구가 시도되어 왔다. 즉, hEGF 유전자를 주로 대장균, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus brevis*, 또는 *Pseudomonas pseudoflava*에 도입하여 발현시키는 연구가 많이 이루어져 현재까지 얻어진 최대의 발현량은 *Bacillus*를 사용하여 1,100 mg/L로 보고되어 있다[2, 7, 14, 24]. 대장균의 경우 Smith 등에 의하여 hEGF 유전자가 합성된 이래로 synthetic gene을 phosphatase의 signal peptide와 결합시켜 *phoA* promoter에 의하여 periplasm으로 발현시키는 system이 대장균을 이용한 연구에 응용되었다[19, 20]. Shimizu 등에 의하여 대장균 발현 체계를 이용한 산업적 접근이 시도되어 *trp* promoter system으로 숙주 세포인 *E. coli* HB101에 형질

전환시켜 fed-batch 배양으로 60 mg/L까지 발현되었다 [18]. 그 이후에는 signal sequence의 여러 가지 아미노산 구조를 고려하여 변형시킨 결과 분비 효율을 상당히 개선시킨 보고가 있었으며 Yadward 등은 *E. coli* JM101 숙주 세포를 사용하여 발효 조건을 개선시킨 결과 최대 250 mg/L까지 발현되었다고 보고하였다[8, 21].

대장균의 고농도 성장과 재조합 단백질의 생성량을 높이기 위하여 탄소원과 에너지원으로서 배지에 glucose를 과량 첨가하게 되면 공급되는 탄소원이 생합성 이용성보다 높아져 혐기적인 대사를 초래하여 그 결과 acetate 같은 유기산이 축적되는 Crabtree 효과를 보인다[5]. 생성된 유기산에 의하여 균체의 농도 및 산물의 생성에 영향을 받게됨으로 acetate 생성을 줄이기 위한 여러 방법이 시도되어 왔다. 유전적인 측면에서의 접근 방법으로 acetyl-CoA로부터 acetate 생성에 관련된 acetate kinase로의 대사 경로를 차단하여 ethanol이나 acetoin과 같이 덜 유해한 물질을 만들게 할 수 있으며 carbon flow의 전환이나 당의 세포내 유입에 관여하는 phosphotransferase 유전자를 조절하여 glucose uptake rate를 바꿈으로 acetate를 적게 생성함으로 고농도 세포 배양이나 protein 생성량을 증가시킬 수 있다[1]. 또한, 배양 조건의 조절에 의한 방법으로 탄소원이나 질소원을 배지 중에 제한

*Corresponding author
Tel. 82-343-52-4111, Fax. 82-343-56-4418
E-mail: youkh@yrc.yuhan.co.kr

함으로 acetate 생성을 줄이는 방법이 모색되었으며, perfusion culture 또는 dialysis나 culture medium을 순환시킴으로 acetate 농도를 일정 수준 이하로 조절하거나 탄소원으로 glucose 대신에 glycerol을 사용하여 acetate 생성을 감소시켰다[4, 9-11].

본 연구에서는 lactose를 탄소원 및 유도 물질의 두 가지 목적을 이루기 위한 dual carbon source로의 가능성을 검토하였다. 아울러 유도 물질의 첨가시기에 따라서 분비 발현 비율 및 양에서 차이를 보이므로[23] rhEGF의 발현 비율이 극대화되는 lactose의 첨가 시기 및 방법을 조사하여 분비 발현을 계속하면서 배지의 고갈로 인한 균체성장 및 발현의 저해를 최소화할 수 있는 배양방법을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

rhEGF를 분비 발현하는 균주는 전사 개시단계 중에 삽입되는 N 말단의 methionine이 제거되고 *pelB* signal sequence를 삽입하여 인체 epidermal growth factor (hEGF)가 직접 분비 발현되도록 고안된 T7 promoter에 의하여 발현되는 *E. coli* BL21(DE3, pYHB101)을 사용하였고[16] recombinant human epidermal growth factor(rhEGF) 표준품은 Boehringer Mannheim사(cat #1444611)에서 구입하였다. 또한, isopropyl- β ,D-thiogalactopyranoside(IPTG)는 Sigma사에서 EGF의 radioimmunoassay kit는 Amersham 사(cat #IM1961)로부터 각각 구입하였고 기타 일반 시약은 Fisher, Junsei, Wako사로부터 yeast extract, tryptone 등은 Difco사, acid hydrolyzed casein은 Oxoid사의 것을 사용하였다.

배지

기본 배지로서 변형된 MBL 배지[21]를 사용하였으며 그 조성은 10 g/L yeast extract, 10 g/L acid hydrolyzed casein, 10 g/L glucose, 3 g/L KH_2PO_4 , 6 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L NaCl, 2 ml/L trace element(27 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.6 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L H_3BO_3)이었으며, pH 7.0이 되도록 제조하여 멸균후 사용하였다. 본 연구에 사용된 발효기는 7 L jar fermenter(Chemap. AG, Switzerland)이었다.

Lactose와 IPTG에 의한 발현 비교

유도 물질이 rhEGF의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MBL 배지를 기초배지로 하여 37°C/150 rpm으로 16시간 진탕 배양된 *E. coli* BL21(pYHB101)을 동일한 배지 50 ml이 들어 있는 250 ml 진탕 flask에 각각

2% 접종하였다. 37°C에서 2시간 동안 배양한 다음 유도 물질로서 IPTG와 lactose를 각각 최종 10 μM 되게 첨가하여 150 rpm으로 48시간 동안 배양하였다.

회분식 발효

1 L baffled flask를 사용하여 30°C에서 150 rpm으로 16시간 진탕 배양된 종균액을 MBL 배지 5 L가 들어있는 발효기에 접종하고 2시간 동안 배양한 다음 최종 10 μM 이 되도록 lactose를 첨가하여 27°C에서 48시간 동안 배양하였다. 발효기의 pH는 5 N NaOH로 pH 7.0을 유지하였다.

유기식 발효

1 L baffled flask에서 30°C/150 rpm으로 16시간 진탕 배양된 종균액을 MBL 배지 5 L가 들어있는 발효기에 접종하고 배양 후, 대수기인 6, 7, 8 시간과 정지기인 17, 18, 19 시간이 지난 다음 yeast extract 12.5 g과 lactose 25 g을 간헐적으로 첨가하여 최종 농도로 0.25%(w/v) yeast extract와 0.5%(w/v) lactose가 되도록하였다.

E. coli BL21(pYHB101) 배양액의 분석

균수 측정 균체 농도는 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며 배지의 흡광도를 blank로 하여 O.D. 값이 1.0이 넘지 않도록 희석하였다.

잔당 측정 Glucose assay kit(Sigma사)를 사용하였으며 combined glucose oxidase color reagent를 미지의 시료 및 standard glucose 용액에 첨가한 후 표준 물질과 비교하여 환원당을 정량하였다. 잔류된 lactose의 양은 Boehringer Mannheim 사의 lactose 정량 kit(cat. 176303)를 사용하였다.

생성된 acetate 정량 Boehringer Mannheim사의 acetate 정량 kit(cat. 148261)를 사용하여 acetyl CoA synthetase(ACS)에 의하여 증가된 NADH의 양을 측정함으로써 acetate를 정량하였다.

E. coli BL21(pYHB101)에 의한 rhEGF 발현의 세포내 위치

1 L의 배양액을 취하여 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 균체를 회수하였고, wet weight 1 g 당 50 mL의 periplasmic buffer(0.5 M sucrose; 0.03 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)를 넣고 현탁하여 10분간 상온에서 방치하였다. 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 생긴 pellet에 동일 부피의 ice-cold water를 넣고 현탁한 후 다시 원심 분리하여 상층액을 취하여 periplasmic fraction sample로 이용하였다. 이때 생긴 pellet에 g당 90 mL의 extraction buffer A(50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM EDTA; 0.25 mg/mL lyso-

zyme; 50 g/mL sodium azide)를 넣고 현탁하여 상온에서 10분간 방치하였다. 100 mL의 extraction buffer B (1.5 M NaCl; 0.1 M CaCl₂; 0.1 M MgCl₂; 0.02 mg/mL DNase I; 0.05 mg/mL ovomucoid protease inhibitor)를 첨가하여 10분간 방치한 후, 15,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 생긴 상층액을 cytoplasmic soluble fraction sample로 하였다. 이때 생긴 pellet에 최종 농도가 0.1%되도록 SDS를 첨가하여 녹인 시료를 cytoplasmic insoluble fraction sample로 하였다[17]. 이상의 각 시료를 RIA에 의하여 정량적으로 조사하였다.

Radioimmunoassay

rhEGF 표준 물질과 각 시료를 assay buffer(10 mM sodium phosphate; pH 7.2, 0.9% NaCl, 0.1% bovine serum albumin)에 희석하여 100 µl의 표준액과 시료를 각각 제조하고 여기에 I¹²⁵-EGF용액(200 cpm/µl)을 100 µl씩 가한 다음 EGF에 대한 IgG 용액을 1:1,000으로 희석하여 200 µl씩 가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 Amerlex-M donkey anti-rabbit reagent(Amersham 사)를 500 µl 첨가하여 20분간 반응시켰다. 반응액을 magnetic separator를 이용하여 donkey anti-rabbit reagent와 결합된 부분만을 회수하고 γ-counter (Berthold LB 951G)에 의해 *E. coli* BL21(pYHB101)로부터 발현된 rhEGF를 정량하였으며 정량값은 3회를 동일 조건으로 반복하여 평균값을 취하였다.

결과 및 고찰

유도 물질이 발현에 미치는 영향

Lac operon 발현체계에서 유도물질로는 세포내 대사에 의하여 분해되지않는 lactose analogue인 IPTG가 일반적으로 사용된다. Glucose를 탄소원으로 이용하는 발효에서 IPTG 대신에 lactose를 유도물질로 사용하면 lactose와 glucose가 동시에 탄소원으로 공급됨으로 cAMP level이 낮아져 mRNA가 적게 합성되어 적은양

의 생성물이 만들어지는 것으로 알려져 있다[12]. Table 1에서와 같이 기본 배지인 MBL 배지에 glucose를 10 g/L되도록 가하여 배양 2시간 후 IPTG와 lactose를 각각 10 µM되도록 첨가하여 48시간 동안 유도 배양한 결과 유도 배양 8시간 후에는 유도 발현이 적게 일어났으나 glucose가 완전히 소모되었을 시점인 48시간 배양에서는 lactose와 IPTG에 의하여 다량의 rhEGF가 발현되었다. 상기의 결과를 종합하여 볼 때 유도 물질로서 IPTG와 lactose는 모두 동일한 발현 효과를 나타내었으며, 최대 발현량은 IPTG를 유도물질로 사용하였을 때 39.5 mg/L이었고 lactose의 경우는 44.5 mg/L이었다.

회분식 발효

회분식 발효(batch fermentation) 조건으로 균의 성장 추이와 rhEGF 생산량을 48시간 동안 배양하면서 관찰하였다. MBL 배지를 기초 배지로 하여 glucose 농도를 10 g/L로 첨가하여 배양하였으며 유도 물질로는 10 µM lactose를 사용하였다. Fig. 1A에서와 같이 glucose는 세포내 당의 유입에 관여하는 phosphotransferase(PTS)에 의하여 조절되는 PTS 당[1]이므로 glucose가 완전히 소모된 후 12시간 이후부터 non-PTS당인 lactose의 유도 배양에 의한 rhEGF의 생성이 시작되어 28시간이 지나서 45 mg/L의 최대 생산량을 보였으며 28시간 이후 배양에서는 균체성장 및 발현량이 감소하는 결과를 보였다(Fig. 1C). 이는 탄소원의 고갈 및 기타 유해한 물질의 축적 등에 의한 현상으로 판단되며 배지에 존재하는 rhEGF 비율의 증가는 균체의 lysis에 기인하는 것으로 추측된다. 한편, rhEGF의 soluble 형태(배지와 periplasm으로 발현된 양)와 insoluble 형태로 발현된 양을 비교하였을 때 90%이상 생물학적인 활성이 있는 soluble 형태로 발현되었다(Fig. 1B).

대수기 유도 배양

회분식 발효에 사용된 MBL 배지를 기초 배지로 하여 glucose 농도를 10 g/L로 첨가하여 48시간 동안 배양하면서 대수기 유도 배양에서 rhEGF 생산 추이를 조사하였다. 유가식 배양에서 *E. coli* BL21의 대수기에 lactose 소모 정도는 시간당 0.5%로 보고되어 있으므로[13] MBL 기본 배지로 균체를 성장시킨 후 유가식 배양(fed-batch fermentation)으로 들어가면서 0.25%(w/v) yeast extract와 0.5%(w/v) lactose의 농도가 되도록 혼합한 배지로 pulse feeding하였다. Fig. 2A에서와 같이 대수기 유도 배양에서 glucose의 농도가 1% 이하인 7시간부터 3 차례에 걸쳐 1시간 간격으로 배양액이 최종 0.5%(w/v) lactose와 0.25%(w/v) yeast extract 농도가 되도록 간헐적으로 주입하였다. 균체 성장 정도는 A₆₀₀에서 최대 18이었으며 배양 20시간 이후부터 급격하게

Table 1. Effect of inducers on rhEGF expression by *E. coli* carrying pYHB101 by flask culture

Inducer (10 µM)	Induction time (hours)	Growth (A ₆₀₀)	rhEGF (mg/L)
IPTG	0	0.23	0
	8	6.13	2.2
	48	9.84	39.5
Lactose	0	0.23	0
	8	7.37	1.4
	48	6.26	44.5

Data are means (mg/L)±S.D. (standard deviation) of three determinations.

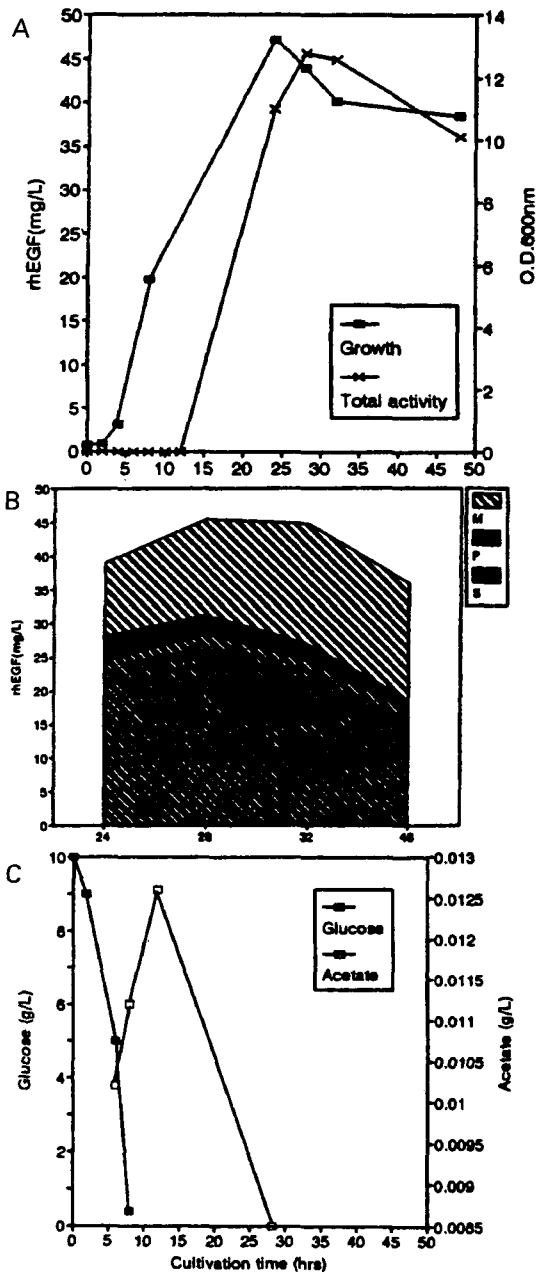


Fig. 1. rhEGF production in batch fermentation using *E. coli* BL21 harboring pYHB101. A; time profile of fed-batch fermentation. B; cellular localization of expressed rhEGF. C; glucose (■), lactose (—), and acetate (□). Abbreviations; S, supernatant; P, pellet; M, medium; T, total; A, induction point; 2 hr with 10 μM lactose.

rhEGF양이 증가하여 32시간 배양에서 전체 발현량이 121 mg/L로 최대이었다. Fig. 2B에서와 같이 배양 시간이 32 시간이 넘어서면서 rhEGF의 발현량이 감소하였다. 배지에 존재하는 rhEGF의 비율은 배양 시간과 비례하여 증가되어 46시간 배양에서 최대 92%이었으며 cytoplasmic insoluble region으로 발현되는 비율은 32시간 배양에서 최대 20.9%에 달하였다. Fig. 3C에서는 대수기

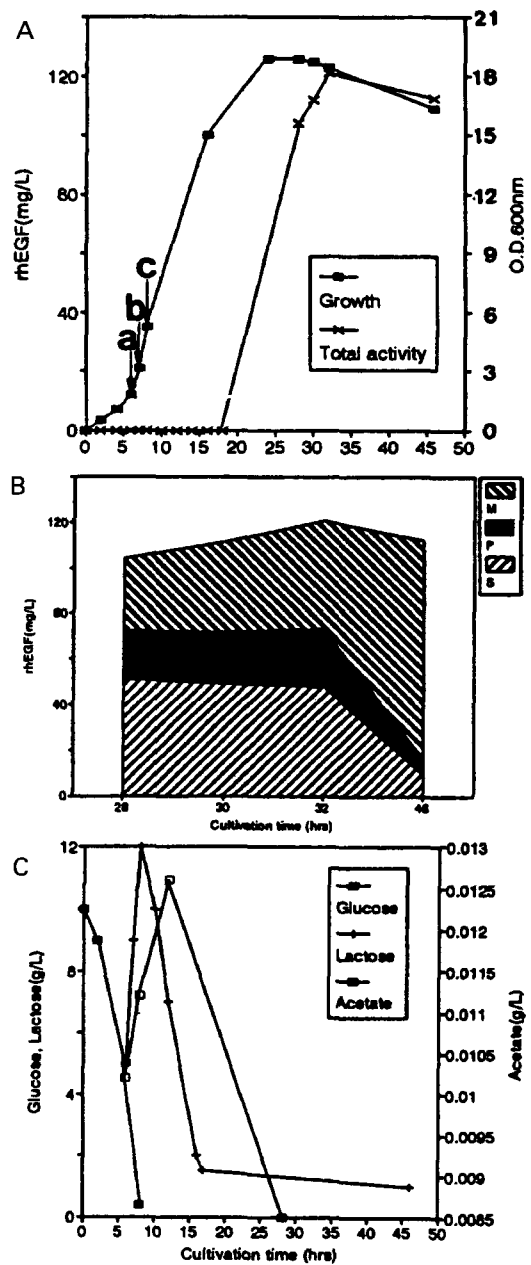


Fig. 2. Effect of early induction for rhEGF production using *E. coli* BL21 harboring pYHB101. A; time profile of fed-batch fermentation. B; cellular localization of expressed rhEGF. C; glucose (■), lactose (—), and acetate (□). Abbreviations; M, medium; S, supernatant; P, pellet. a, b, c, feeding points; After 7(a), 8(b), 9(c) hrs of culture, 5%(w/v) lactose and 2.5%(w/v) yeast extract were fed.

유도 배양에서 glucose와 lactose, 유기산인 acetate의 잔류량을 나타내고 있다. Glucose의 경우 배양 10시간에서 거의 소모되었으며 non-PTS당인 lactose의 경우 0.1% 이하이었다. Acetate의 경우 5 g/L이상 배양액에 잔류할 경우 균체 성장 및 발현량에 영향을 준다고 보고[6]하고 있으나 본 배양 조건에서는 0.009 g/L정도로 배양에 거

의 영향을 미치지 않는 수준이었다.

정지기 유도배양

본 발효에 활용한 균주인 *E. coli* (pYHB101)은 pelB signal sequence를 삽입하여 인체 epidermal growth factor(hEGF)가 직접 분비 발현되도록 고안된 T7 promoter에 의하여 발현되는 발현 체계를 갖고 있다. T7 promoter를 갖는 발현체계는 비교적 불안정하여 24시간 이상 배양 조건에서 plasmid의 유지 정도가 4~5%에 불과하였으므로[15] soluble rhEGF를 대량으로 획득하기 위하여 정지기에 유도 물질 및 영양분을 첨가하였다. 정지기 유도 배양으로 Fig. 3A에서와 같이 거의 최대 균체 성장에 이르렀을 때인 17시간부터 1시간 간격으로 3 차례에 걸쳐서 yeast extract 0.25%와 lactose 0.5%의 농도가 되도록 배지를 주입하여 균체성장은 최대 A₆₀₀에서 22.5이었다. Fig. 3A에서와 같이 이때에는 앞서의 대수기 유도보다 발현 시기가 당겨져 배양 30시간에서 160 mg/L로서 최대의 rhEGF가 발현되었다. 또한, Fig. 3B에서와 같이 배양 26~44시간 사이의 세포내 발현 위치는 대수기 유도보다 배지와 periplasm region으로 발현되는 비율이 증가되어 95%에 이르렀고 cytoplasmic inclusion region의 발현 비율은 5% 내외에 불과하였다. 특히, 대수기 유도에서 최대의 생성량을 보인 32시간 배양에서 inclusion body의 비율은 20.9%이었으나 정지기 유도에서는 최대의 생성량을 보인 30시간 배양에서 inclusion body의 비율이 5.7%에 불과하였다. 특히, 정지기 유도배양에서 soluble한 형태의 rhEGF가 대수기 유도배양에 비하여 4배이상 증가한 것은 signal sequence를 삽입하여 분비 발현을 유도하는 배양에서는 배양조건의 개선이나 chaperone의 삽입에 의한 것[22]과 유사하게 정지기에 유도 배양한 것이 단백질의 적절한 folding에 도움을 주어 생물학적인 활성을 갖는 soluble한 형태의 rhEGF의 비율이 증가한 것으로 추정된다.

Fig. 3C에서는 정지기 유도 배양에서 glucose와 lactose 및 유기산인 acetate의 잔류량을 나타내고있다. Glucose의 경우 배양 10시간에서 거의 소모되었으나 lactose의 경우 40시간 이후 0.05% 이하 수준으로 잔류되었다. Acetate의 경우 본 배양 조건에서도 대수기 유도와 비슷한 0.009 g/L정도로 배양에 거의 영향을 미치지 않는 수준이었다. Fig. 4에서는 정지기 유도 배양에서 발현된 rhEGF의 SDS-PAGE 결과를 나타내고 있다.

상기의 결과에 의하면 T7 promoter에 의하여 발현이 조절되는 pYHB101의 경우 대수기 유도로 장시간 유도 배양을 하면 plasmid의 결실로 인하여 발현율 및 균체성장량이 감소하였다. 따라서 정지기에 유도하여 유도 배양 시간을 12시간 이내로 하는 것이 균체의 성장 및 발현을 증가시킬 수 있다. 또한 rhEGF는 prokaryotes system

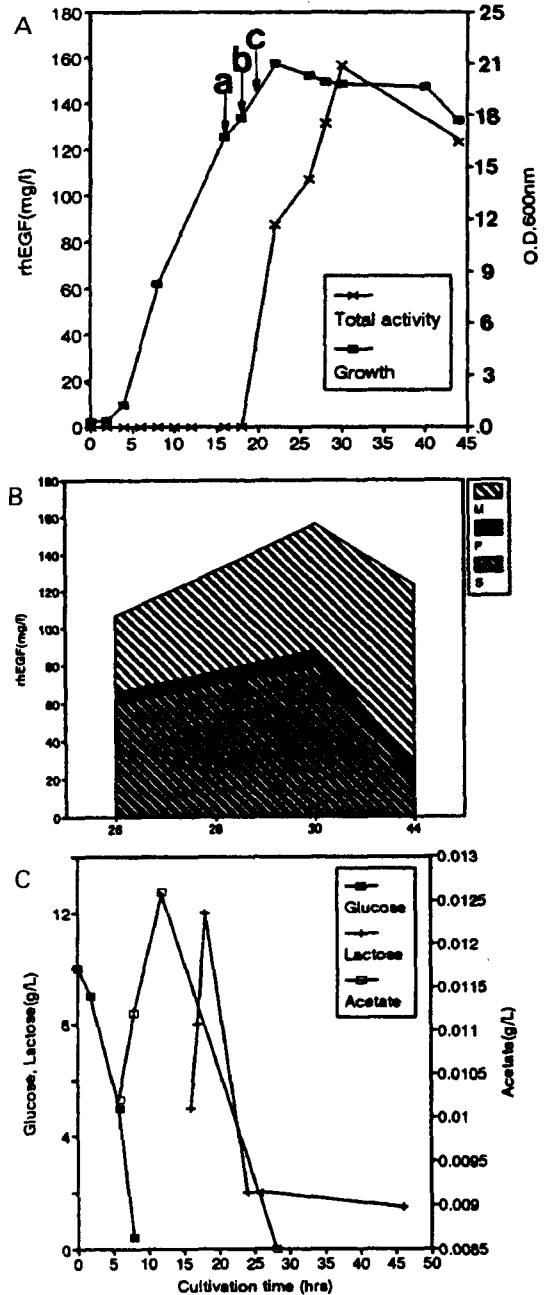


Fig. 3. Effect of late induction for rhEGF production using *E. coli* BL21 harboring pYHB101.

A; time profile of fed-batch fermentation. B; cellular localization of expressed rhEGF. C; glucose (■), lactose (—), and acetate (□). Abbreviations; M, medium; S, supernatant; P, pellet. a, b, c, feeding points; After 17(a), 18(b), 19(c) hrs of culture, 5%(w/v) lactose and 2.5%(w/v) yeast extract were fed.

에서 특이하게 배지로 배출된다는 점과 inducer로 작용하는 lactose가 *E. coli* BL21의 탄소원으로도 작용한다는 점을 고려하였다. 기존의 유가식 발효에서는 영양분만을 계속적으로 공급하여 균체의 성장을 지속시키지만 본 발효에서는 탄소원 및 유도 물질로서 lactose와 질소원으로

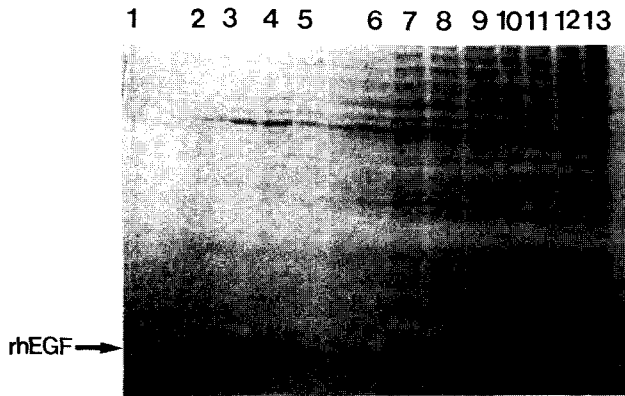


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins from cells carrying pYHB101 at late induction.

In all cases, samples applied to the gel equivalent to 20 µl cultures. Lanes 1, standard rhEGF (2 µg); 2, medium after 7 hr culture; 3, medium after 25 hr culture; 4, medium after 30 hr culture; 5, medium after 40 hr culture; 6, soluble cell extract after 7 hr culture; 7, soluble cell extract after 25 hr culture; 8, soluble cell extract after 30 hr culture; 9, soluble cell extract after 40 hr culture; 10, inclusion body pellet after 7 hr culture; 11, inclusion body pellet after 25 hr culture; 12, inclusion body pellet after 30 hr culture; 13, inclusion body pellet after 40 hr culture.

서 yeast extract를 첨가함으로써 rhEGF의 발현 유도과 균체의 성장을 동시에 시도하였다. 이상의 배양방법을 RIA에 의한 volumetric productivity로 비교하면 회분식 배양에 비하여 대수기 유도배양은 2.7배, 정지기 유도배양은 3.5배 높은 생산성을 보였으며 발현된 rhEGF 중에서 94% 이상이 생물학적인 활성을 갖는 soluble 형태로 발현되었다. 이로써 본 저자 등에 의하여 개발된 rhEGF 생산균주는 실제 산업적인 규모의 대량 생산에 직접적인 적용가능성이 있는 것으로 사료된다.

요 약

재조합 인간상피세포 성장인자(rhEGF)가 *E. coli* BL21(pYHB101) 균주를 사용하여 발현되었다. 10 g/L glucose를 첨가한 변형된 MBL 배지를 사용하여 10 µM IPTG/lactose로 2시간 동안 유도배양한 후 27°C에서 48시간 동안 배양하였을 때 44.5 mg/L의 rhEGF가 발현되었다. 상기의 결과는 *E. coli* BL21(pYHB101)를 사용하여 rhEGF를 발현시 lactose를 IPTG와 동일한 유도물질로 사용가능하다는 것을 시사하는 것이다. 회분식 배양에서 glucose를 10 g/L 첨가한 변형된 MBL 배지에 유도물질로 10 µM lactose를 사용하였으며 28시간 동안 배양하였을 때 최대 45 mg/L의 rhEGF가 발현되었다. 유가식 배양에서 정지기에 0.5%(w/v) lactose와 0.25%(w/v) yeast extract를 첨가하였을 때 160 mg/L의 rhEGF가 발현되었으며 94.3%가 분비되었다. 이에 비하여 유도

기에 lactose를 첨가한 경우는 120 mg/L의 rhEGF가 발현되었으며 cytoplasm으로 발현된 불용성 봉입체의 비율은 20.9%에 달하였다. 이것은 lactose의 첨가시기가 *E. coli* BL21(pYHB101)로부터 soluble rhEGF의 생성에 중요하다는 것을 확인한 결과이다.

참고문헌

1. Aristidou, A. A., K. Y. San, and G. N. Bennett. 1995. Metabolic engineering of *E. coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biotechnol. Prog.* **11**: 475-478.
2. Carlos, G. N., G. S. Alexander, and H. Michell. 1988. Characterization of recombinant human epidermal growth factor produced in *Yeast*. *Biochemistry* **27**: 797-802.
3. Cohen, S. 1960. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**: 302-311.
4. Curless, C., K. Fu, R. Swank, A. Menjares, J. Fieschko, and L. Tsai. 1991. Design and evaluation of a two-stage, cyclic recombinant fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1082-1090.
5. Doelle, H. W., K. N. W. Ewings, and N. W. Hollywood. 1992. Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. *Adv. Biochem. Eng.* **23**: 1-35.
6. Gregory, W. L. and W. R. Strohl. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *E. coli* strains in batch and fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1004-1011.
7. Hideo, Y., N. Kazuo, and Y. Suzuki. 1989. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3589-3593.
8. Kazuko, M. F., R. Marumoto, and T. Fukuda. 1991. Modified enterotoxin signal sequences increase secretion level of the rhEGF in *E. coli*. *J. Bio. Chem.* **266**: 1728-1732.
9. Korz, D. J., U. Rinas, K. Hellmuth, E. A. Sanders, and W-D. Decker. 1995. Simple fed-batch technique high cell density cultivation of *E. coli*. *J. Biotechnol.* **30**: 59-65.
10. Lee, S. Y. 1996. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **14**: 98-105.
11. Markl, H., C. Zennneck, Ch. A., and J. C. Ogonna. 1993. Cultivation of *E. coli* to high cell densities in dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 48-52.
12. Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Press. **3**: 43-80.
13. Neubauer, P. and K. Hofmann. 1994. Efficient use of lactose for the *lac* promoter controlled overexpression of the main antigenic protein of the foot and mouse disease virus in *E. coli* under fed-batch fermentation conditions. *FEMS Microbiology Reviews* **14**: 99-102.

14. Nobuki, H., A. Ishiyama, and M. Niwano. 1994. Secretion of human epidermal growth factor in autotrophic culture by a recombinant hydrogen-utilizing bacterium, *Pseudomonas pseudoflava*, carrying broad-host-range EGF secretion vector pSKEGF2. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3336–3342.
15. Park, S. C. and K. H. You. 1996. Purification and characterization of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 478–484.
16. Park, S. C., J. H. Nom, J. K. Kim, T. J. Kwon, I. Y. Ko, and K. H. You. 1996. A set of high expression plasmids for recombinant human epidermal growth factor secreted by pleB signal sequence in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 553–559.
17. pET System Manual. 1994. *Novagen Inc.* 4th ed. 15–26.
18. Shimizu, N., S. Fukuzono, Y. Harada, and K. Fujimori. 1989. Mass production of human epidermal growth factor using fed-batch cultures of recombinant *E. coli*. *Biotech. Bioeng.* **38**: 37–42.
19. Smith, J., E. Cook, I. Fotheringham, S. Pheby, R. Derbyshire, M. A. W. Eaton, M. Doel, D. M. J. Lilley, J. F. Pardon, T. Patel, H. Lewis, and L. D. Bell. 1982. Chemical synthesis and cloning of a gene for human β -urogastrone. *Nuc. Acids. Resear.* **10**: 4467–4482.
20. Takanori, O., S. Sakamoto, K. Miyoshi, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki, G. Tamura, and T. Miyake. 1985. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7212–7216.
21. Yadwad, V. B., S. Wilson, and O. P. Ward. 1994. Production of human epidermal growth factor by an ampicillin resistant recombinant *E. coli* strain. *Biotech. Lett.* **16**: 885–890.
22. Yasukawa, T., C. Kaneishi, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto, and S. Tshii. 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *E. coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**: 25328–25331.
23. Yee, L. and H. W. Blanch. 1993. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 781–790.
24. Yoshio, T. O. Miyashita, T. Fukuda, and T. Hamana. 1986. Direct expression of a chemically synthesized human epidermal growth factor gene in *E. coli*. *J. Takeda Res. Lab.* **45**: 136–147.

(Received November 15, 1997)