

## 재조합 Alkaline Protease를 대량 생산하는 *Aspergillus oryzae* 균주개발

이병로 · 유기원 · 최원균 · 최동성<sup>1</sup> · 임한진<sup>2</sup> · 성창근\*

충남대학교 식품공학과, <sup>1</sup>우석대학교 환경 및 생물공학부, <sup>2</sup>한림기연

**Breeding of *Aspergillus oryzae* for the Alkaline Protease Overproducing Strain.** Lee, Byung Rho\*, Ki Won Yoo, One Kyun Choi, Dong Seong Choi<sup>1</sup>, Han Jin Lim<sup>2</sup>, and Chang Kun Sung\*. Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea, <sup>1</sup>Division of Biotechnology and Environmental Engineering, Woosuk University, Chonbuk 565-800, Korea, <sup>2</sup>Hanlim Technology and Research, Korea - *Aspergillus oryzae* M-2-3 strain (*argB*) was transformed with pTAalp plasmid which was constructed for expression of the alkaline protease gene, *alpA*, and 16 transformants were selected on arginine minus medium. When these transformants were tested for productivity of alkaline proteases using agar plate containing skim milk, the halo was observed around each colony of transformants, but not observed around the host strain in this condition. Southern analysis showed that the pTAalp plasmid having *alpA* gene was integrated into the chromosome of the host strain. The highest level of alkaline protease production was obtained in the culture filtrate of the transformant No. 14, which was estimated to 80-90% of total secreted proteins, and the enzyme activity was 64-450 times higher than those of host strain and industrial strain. Total nitrogen content and the digestion rate in soybean Koji extracts were also increased to 1.5 times in *Aspergillus oryzae* transformant No. 14.

**Key words:** *Aspergillus oryzae*, expression, protease

*Aspergillus* 속은 유기산 및 산업용 효소를 생산하는 유용한 미생물일 뿐만이 아니라, 옛부터 전통 발효식품인 간장, 된장, 청주, 소주 등의 코지 제조에 이용되어온 미생물로 오랫동안 검증을 거친 안전한 균주로 인식되어 있으며, 오늘날에는 이용 목적에 따라 많은 균주가 선발 육종되어 산업적으로 이용되고 있다. 즉, 주류산업에 이용되는 *Aspergillus oryzae*는 amylase 활성이 강하고 protease 활성이 낮은 균주를 선발 육종하여 사용하고 있으며, 간장, 된장 등에 사용하는 균주는 protease 역가가 높은 균주를 선발 육종하여 이용하고 있다.

*A. oryzae*가 생산하는 균체의 protease는 산성영역에서 활성을 나타내는 endo형의 산성 protease인 aspartic proteinase(Aspergillopepsin)[17, 18]와 exo형의 serine carboxypeptidase O[13], O-1[13], O-2[13]가 알려져 있고, 중성영역에서 활성을 나타내는 endo형의 중성 protease인 neutral protease I, II(metallo proteinase)[8, 16], 알칼리 영역에서 활성을 나타내는 endo형의 alkaline protease(serine proteinase)[10]가 알려져 있다. 특히 alkaline protease는 간장양조에 있어서 맛 생성에 중요한 역할을 하고 있으므로[15] *A. oryzae*의 돌연변이[4], 프로토플라스트 융합[2] 등의 방법에 의하여 이 효

소의 생산성이 높은 균주를 육종하여 산업용으로 사용하고 있다. 최근에는 alkaline protease 유전자(*alpA*)가 클로닝되었고[1, 5, 7, 14, 15], 유전자 재조합에 의하여 이 효소의 생산성을 높이는 균주 육종이 시도되어 효소 생산성이 5배나 높은 균주가 만들어졌다[1]. 본 연구진도 이미 실험실용 균주인 *A. oryzae* RIB40으로부터 *alpA*를 클로닝하여 구조를 해석한 결과 태국의 산업용 균주 혹은 일본의 산업용 균주 *A. oryzae* ATCC 20386이 생산하는 alkaline protease와 단백질 수준에서는 차이가 없음을 밝힌 바 있다[5].

본 연구에서는 *alpA*의 구조유전자를 고발현시키는 재조합 플라스미드를 *A. oryzae*에 도입하여 alkaline protease를 대량으로 생산하는 균주를 만들었으며, 이 균주의 간장 양조에의 이용 가능성을 알아보기 위하여 간장 원료 분해시험을 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주, 플라스미드 및 배지

*Aspergillus oryzae* M-2-3(*argB*)[3]를 곰팡이 형질전환의 숙주로 사용하였고 alkaline protease 활성 비교를 위한 대조균주로서 간장 양조에 *A. oryzae*를 화염식품(주)으로부터 분양받아 사용하였으며 플라스미드 pTAalp를 alkaline protease의 대량생산을 위한 재조합

\*Corresponding author  
Tel. 82-42-821-6722, Fax. 82-42-821-2287  
E-mail: kchsungg@chollian.net

플라스미드로 사용하였다. 균체 배양을 위해서는 YPD배지(2% polypeptone, 2% glucose, 1% yeast extract)를, 효소생산용 배지로서는 DPY배지(2% dextrin, 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )를 사용하였다. Halo 생성은 Czapek-Dox, 1% starch, 1% skim milk, 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% agar, 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)의 배지에서 관찰하였다.

### 재조합 플라스미드의 제조

*Aspergillus oryzae*의 *alpA* 유전자가 pUC118의 *SacI* 부위에 삽입된 플라스미드 pAlp[5]로부터 single strand DNA를 얻은후 site-directed mutagenesis[6]에 의해 *alpA*의 개시 코돈 ATG의 14 염기 upstream region에 *XbaI* 제한효소 부위를 도입하고, 이 유전자를 *XbaI*으로 잘라 구조유전자를 포함하는 1.7 kb DNA 단편을 얻어 Klenow 효소로 처리하여 blunt end를 만들었다. 이 1.7 kb DNA 단편을 *A. oryzae*의 고발현 벡터 pTAex3의 *amyB* 프로모터와 터미네이터 사이에 blunt-end ligation에 의해 삽입하여 *alpA*의 고발현 재조합 플라스미드 pTAalp를 만들었다.

### *Aspergillus oryzae*의 형질전환

*Aspergillus oryzae* M-2-3 균주를 YPD배지에서 30°C, 24시간 배양한 다음 균사체를 회수하여 프로토플라스트를 만들었다. 여기에 플라스미드 pTAalp를 넣고 Gomi 등의 방법[3]에 의하여 *A. oryzae*를 형질전환시켰으며 형질전환체의 선택 표지 marker로서는 *Aspergillus nidulans*의 *argB*(ornithine carbamoyl transferase)유전자를 이용하였다. 이 형질전환체의 homokaryon을 얻기 위하여 5회 이상 분생포자를 선택배지에서 계대배양한 후 본 실험에 사용하였다.

### Halo formation

Halo 형성배지에 각 형질전환체의 포자를 접종하고 30°C에서 2일간 배양한 다음 halo의 크기를 관찰하였다.

### Southern blot analysis

형질전환체를 YPD 배지에서 30°C, 24시간 배양한 다음 균사체를 회수하여 액체질소속에 넣고 동결시킨 다음 막자사발과 막자를 이용하여 곱게 마쇄하였다. 여기에 DNA 추출용 완충액(50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA, 0.5% SDS)을 첨가하여 DNA를 추출하였으며 페놀 추출의 반복과 에탄올 침전에 의하여 genomic DNA를 정제하였다. Genomic DNA 1 µg을 *KpnI*으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후 나일론 막인 Hybond-N<sup>+</sup>에 전사하였다. Southern hybridization은 Sambrook 등의 방법(11)에 의해 행하였으며 플라스

미드 pAlp에 존재하는 *alpA*의 1.7 kb *KpnI* 단편을 probe로 하여 ECL labeling and detection Kit(Amersham, UK)로 시그널을 검출하였다.

### 효소활성 측정

Halo 형성능이 큰 형질전환주 No.14를 DPY 배지에서 30°C, 6일간 배양하면서 주기적으로 배양액을 취하여 여과한 다음 그 여액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성의 측정은 Anson 법[9]을 변형하여 측정하였다. 즉, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0 at 30°C)에 용해한 0.5% milk casein 용액 2 ml에 조효소액 10 µl를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 다음 TCA 용액(0.1 M trichloroacetic acid, 0.2 M sodium acetate, 0.3 M acetic acid) 2 ml를 가하여 반응을 정지시키고 2500 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상등액 1 ml에 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5 ml를 첨가하여 혼합하고 페놀 시약( $\text{H}_2\text{O}$ 로 5배 희석) 1 ml를 첨가하여 30°C, 30분간 방치한 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 pH 7.0, 50°C에서 1분당 milk casein으로부터 1 µg의 tyrosine 상당량의 흡광도를 증가시키는 산 가용성 물질을 생성하는 효소의 양을 1 protease unit(PU)로 정하였다.

### 간장 원료 분해실험

탈지대두와 황색소맥 각 30 g씩을 혼합하여 36 ml의 물을 가하고 110°C에서 30분간 살균 증자한 다음 No. 14 형질전환체를 접종해서 30°C에서 3일간 배양하였다. 이 간장코지에 240 ml의 식염수를 가하여 식염농도를 8, 17%로 각각 조정하고 50°C에서 48시간 동안 원료를 분해한 다음 여과하였다. 총질소는 Kjeldahl 법에 의하여 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### *Aspergillus oryzae*의 형질전환

Alkaline protease의 구조유전자를 높은 수준으로 발현시키기 위하여 이 구조유전자를 곰팡이에서 가장 강력한 프로모터로 알려진 *amyB* 프로모터[12]에 연결하고 *argB* 유전자를 선택표지 marker로 하는 재조합 플라스미드 pTAalp를 제조하였다(Fig. 1). *A. oryzae* M-2-3 균주(*argB*)를 pTAalp로 형질전환시켜 arginine이 없는 최소배지에서 생육하는 형질전환체 16개를 분리하였다. 이 형질전환체들의 halo 형성능(alkaline protease 생산성)을 Fig. 2에 나타내었으며 대조균인 *A. oryzae* MC 균주(오른쪽 사진 중앙)는 halo 형성능을 나타내지 않는데 비하여 형질전환체 No. 2, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 14는 큰 halo 형성능을 보였다. 이 결과는 W.T. *alpA*는 배지에 존재하는  $\text{NH}_4^+$ 에 의하여 발현이 억제되는 조건에서도

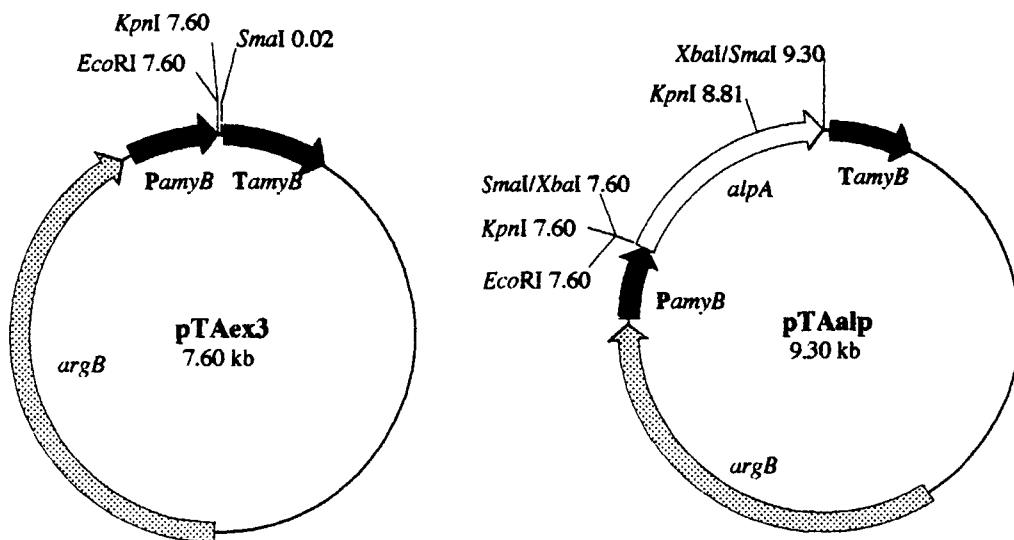
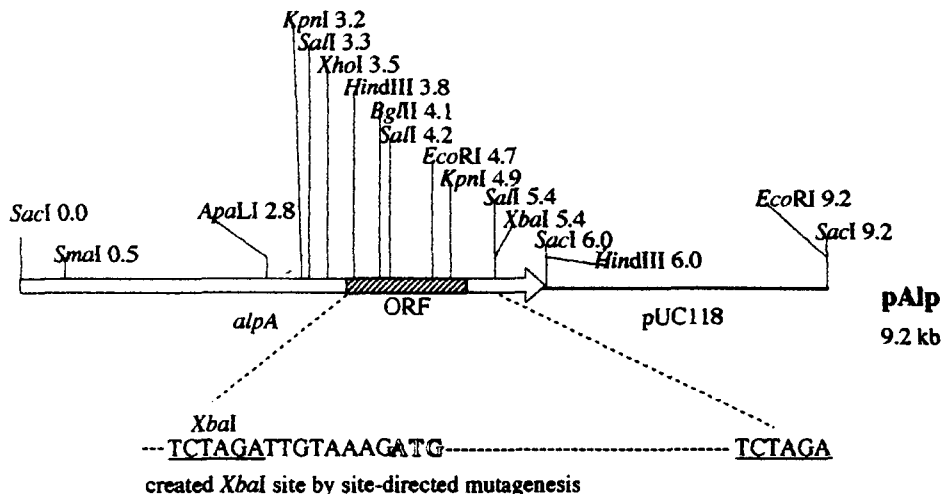


Fig. 1. Plasmids used in this work. Plasmid pTAalp was constructed by inserting the blunted 1.7 kb *XbaI* fragment from site-directed mutagenized pAlp into *SmaI* site of pTAex3.

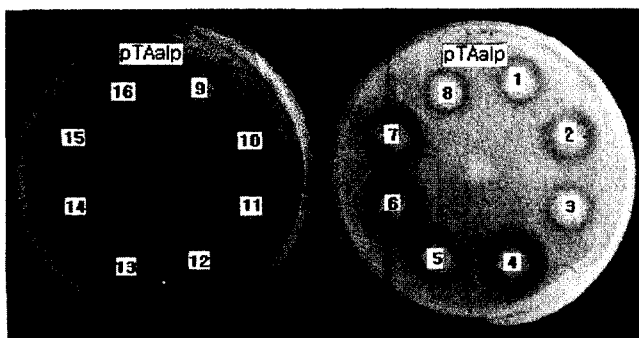
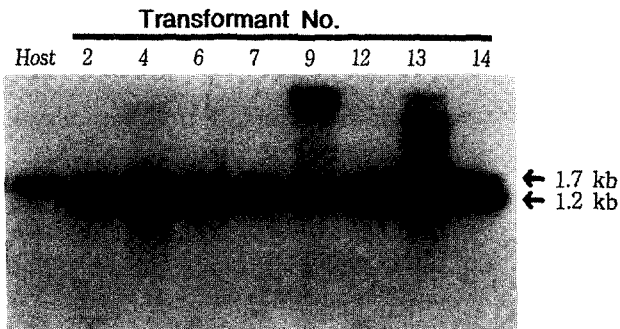


Fig. 2. Halo formation of *A. oryzae* transformants harboring pTAalp.

All transformants were grown on Czapek-Dox medium (pH 8.0) containing 1% starch, 1% skim milk, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 2% agar at 30°C for 2 days. Transformants denote by number and control strain, *A. oryzae* MC, is center of right. This control strain is *A. oryzae* transformed with pTAex3.

재조합 플라스미드 유래의 *amyB*-*alpA*는 전분 유도에 의해 *amyB* 프로모터하에서 *alpA*가 높은 수준으로 발현되고 있음을 시사하고 있다.

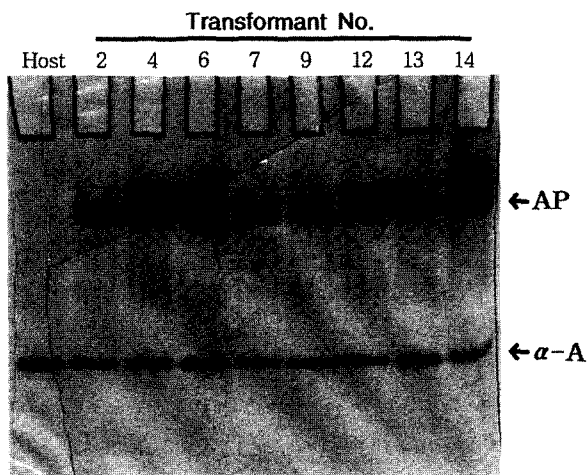
Fig. 3에서는 이들 균주에 대하여 pTAalp가 *A. oryzae*의 게놈 중에 삽입되었는지의 여부를 Southern blot에 의하여 확인하였다. *alpA*의 promoter와 ORF에는 각각 *KpnI* site가 있으며 *KpnI* 절편은 1.7 kb이다. 그러나 재조합 플라스미드 pTAalp에서는 cloning site에 *KpnI* 부위가 있으므로 그 절편은 1.2 kb이다. 예상대로 Southern blot의 결과 1.2 kb의 플라스미드 유래의 시그널이 숙주 균주에서는 보이지 않았지만 형질전환체에서는 시그널이 강하게 나타났다. 한편 숙주 균주에서는 chromosome 유래의 1.7 kb의 단일 band가 검출되었다. 이는 *alpA*가 single copy로 존재한다는 증거이며 이 시그널은



**Fig. 3. Southern blot analysis of chromosomes from *A. oryzae* transformants.**

One  $\mu$ g of each chromosome DNA extracted from transformants was digested with *Kpn*I and separated on 0.8% agarose gel. Southern blot analysis was done using the enhanced chemiluminescence detection system according to user's manual from the supplier (Amersham, UK). When the 1.7 kb *Kpn*I fragment from *alpA* gene was used as a probe, the signals at about 1.7 kb and 1.2 kb correspond to the 1.7 kb *Kpn*I fragment of the chromosome DNA and the 1.2 kb *Kpn*I fragment of the pTAalp, respectively.

형질전환체 모두에서도 나타났다. 이는 pTAalp가 *alpA* 영역 이외의 곳에 도입된 heterologous recombination의 chromosomal integration을 나타낸다. 또한 플라스미드 유래의 시그널인 1.2 kb band는 1.7 kb band에 비하여 형질전환체에서만 강하게 나타났으므로 형질전환체는 pTAalp가 *A. oryzae* M-2-3의 chromosome에 최소한 2 copy 이상으로 삽입되었음을 알 수 있었다.



**Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of the culture filtrates of *A. oryzae* transformants.**

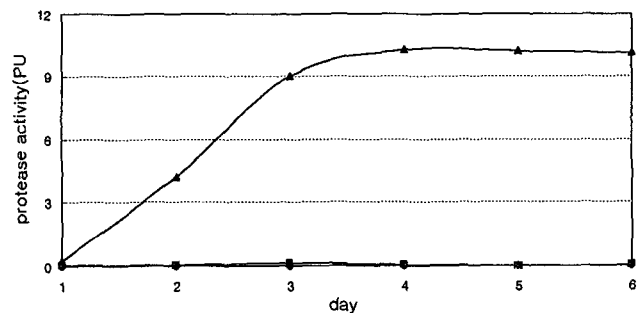
The transformants were grown in DPY medium at 30°C for 3 days. Ten  $\mu$ l of each culture filtrate was separated by native polyacrylamide gel electrophoresis, and proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. AP and  $\alpha$ -A denote alkaline protease and  $\alpha$ -amylase, respectively.

**Alkaline protease의 overproduction**

재조합 alkaline protease의 분비 생산 정도를 조사하기 위하여 형질전환체를 DPY배지에서 30°C, 3일동안 배양하고 그의 배양액 10  $\mu$ l를 polyacrylamide gel 전기영동(Native-PAGE)하여 분비된 단백질을 분석하였다 (Fig. 4). Polyacrylamide gel 상에서  $\alpha$ -amylase 밴드는 숙주균과 형질전환체 모두에서 관찰되었으나 (활성염색에 의하여 확인) alkaline protease 밴드는 형질전환체에서만 관찰되었다. SDS-PAGE 상에서도 54 kD의  $\alpha$ -amylase가 텍스트린 유도에 의해 숙주균과 형질전환체 모두에서 생산되었으나 텍스트린 유도에 의해 분자량 35 kD의 alkaline protease 밴드는 숙주균인 *A. oryzae* M-2-3에서는 보이지 않았고 형질전환체에서만 확실한 밴드로서 나타나 높은 수준으로 생산되었음을 알 수 있었다 (data not shown). densitometer로 측정된 결과 형질전환체 No.14에서는 배지중에 생산된 alkaline protease가 전체 분비단백질 중 80-90%를 차지하고 있었다.

분비생산된 Alkaline protease의 효소활성을 정량하기 위하여 Fig. 2, 4의 결과에서 alkaline protease의 생산능이 우수한 것으로 생각된 No. 14 균주를 DPY 배지에 배양하면서 주기적으로 효소 활성을 측정하였다(Fig. 5). 숙주균과 대조균인 간장양조용 *A. oryzae*는 배양 3-4일경에 효소 활성이 가장 높았으며 0.02-0.16 PU/ml의 효소생산을 나타내었고, No. 14는 배양 4-5일경에 효소생산이 가장 높았으며 10.3 PU/ml의 효소활성을 나타내었다. 이는 No. 14가 숙주균과 대조균에 비하여 효소생산성이 64-450배나 높은 것을 나타낸다. 이 결과는 *alpA*의 구조유전자를 고발현시키는 재조합 플라스미드를 multi-copy로 *A. oryzae*에 도입한 것에 기인한 것이며, 이 형질전환균주의 효소생산, 간장·된장 등의 산업분야에 이용 가능성이 제시되었다.

간장 양조에의 이용 가능성을 알아보기 위하여 간장



**Fig. 5. Alkaline protease production of *A. oryzae* transformant No.14. The transformant was grown in DPY medium at 30°C for 6 days. Fifty  $\mu$ l of aliquots from the culture broth were assayed the protease activity by the modification of Anson's method.**

Symbols: ▲, *A. oryzae* transformant No.14; ■, *A. oryzae* M-2-3; ◆, *A. oryzae* from Whayoung Foods Co.

**Table 1. Comparisons of TN and digestion rate for soybean sauce materials**

Strain	TN (%)		Digestion rate (%)	
	at salt concentration		at salt concentration	
	8%	17%	8%	17%
Transformant No. 14	0.521	0.466	45.4	40.8
Industrial <i>A. oryzae</i> *	0.368	0.313	32.0	27.3

\**A. oryzae* used for soy sauce production was gifted by Hwayoung Foods Co.

원료 분해시험을 하였다. 분해후의 분해액의 전질소 농도(TN)와 원료의 산 가수분해물에 대한 원료분해율은 Table 1과 같다. 비록 이들 동안의 짧은 기간 때문에 단백질이 완전분해에까지 이르지 않는다고 할지라도 형질 전환체의 분해액에서는 간장양조용 대조군의 분해액보다도 TN이 증가하였으며 원료분해율도 또한 1.4-1.5배로 증가되었다. 이러한 결과로부터 protease 대량생산균주는 간장양조에 있어서 TN의 증가 및 숙성기간의 단축에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

Alkaline protease를 대량생산하는 *Aspergillus oryzae*를 만들기 위하여 *A. oryzae*의 alkaline protease 유전자 *alpA*를 고발현시키는 plasmid pTAalp를 제조하고 이 plasmid로 *A. oryzae* M-2-3 균주를 형질전환시켰다. 16개의 형질전환체를 얻어 이들의 protease 생산성을 skim milk 분해에 의한 halo 형성능에 의하여 확인 하였다. 또한 protease 생산성이 증가한 형질전환체는 pTAalp가 multi-copy로 염색체 안에 integration되어 있음을 Southern blot에 의하여 확인하였고, 이들의 배양액을 polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 분석한 결과, 형질전환체 No. 14에서는 전체 분비단백질의 80-90%가 alkaline protease임을 알 수 있었다. 간장원료 분해시험의 결과 No. 14에 의한 원료분해액은 간장 양조용 대조균에 의한 분해액보다 TN이 증가하였으며 원료분해율도 1.4-1.5배로 증가되었다.

## 감사의 글

본 연구의 일부는 1996년도 공업기술개발사업에 의해 지원을 받았으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Cheevadhanarak, S., D. V. Renno, G. Saunders, and G. Holt. 1991. Cloning and selective overexpression of an alkaline protease-encoding gene from *Aspergillus oryzae*.

*Gene* 108: 151-155.

- Furuya, T., M. Ishige, K. Uchida, and H. Yoshino. 1983. Koji mold breeding by protoplast fusion for soy sauce production. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* 57: 1-8.
- Gomi, K., Y. Iimura, and S. Hara. 1987. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.* 51: 2549-2555.
- Kalayanamitr, A., A. Bhumiratana, T. W. Flegel, T. Glin-sukon, and A. Shinmyo. 1987. Occurrence of toxicity among protease, amylase, and color mutants of a non-toxic soy sauce koji mold. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1980-1982.
- Kim, J. H., B. R. Lee, D. K. Oh, T. K. Lee, and K. S. Chae. 1996. Cloning and nucleotide sequencing of the gene (*alpI*) encoding alkaline protease from *Aspergillus oryzae*. *Food Biotech.* 5: 142-145.
- Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492.
- Murakami, K., Y. Ishida, A. Masaki, H. Tatsumi, S. Murakami, E. Nakano, H. Motai, H. Kawabe, and H. Arimura. 1991. Isolation and characterization of the alkaline protease gene of *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 2807-2811.
- Nakadai, T., S. Nasuno, and N. Iguchi. 1973. Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 37: 2703-2708.
- Nakadai, T., S. Nasuno, N. Iguchi. 1993. Purification and properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 37: 2685-2694.
- Nakagawa, Y. 1970. Alkaline proteases from *Aspergillus*. *Methods Enzymol.* 19: 581-591.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tada, S., K. Gomi, K. Kitamoto, K. Takahashi, G. Tamura, and S. Hara. 1991. Construction of a fusion gene comprising the Taka-amylase A promoter and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*. *Mol. Gen. Genet.* 229: 301-306.
- Takeuchi, M. and E. Ichishima. 1986. A 155 K acid carboxypeptidase O from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 50: 633-638.
- Tatsumi, H., M. Ohsawa, R. F. Tsuji, S. Murakami, E. Nakano, M. Motai, A. Masaki, Y. Ishida, K. Murakami, H. Kawabe, and H. Arimura. 1988. Cloning and sequencing of the alkaline cDNA from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 52: 1887-1888.
- Tatsumi, H., Y. Ogawa, S. Murakami, Y. Ishida, K. Murakami, A. Masaki, H. Kawabe, H. Arimura, E. Nakano, and H. Motai. 1989. A full length cDNA cloning for the alkaline protease: Structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 33-38.
- Tatsumi, H., S. Murakami, R. Tsuji, Y. Ishida, K. Mu-

- rakami, A. Masaki, H. Kawabe, H. Arimura, E. Nakano, and H. Motai. 1991. Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 97–103.
17. Tsujita, Y. and A. Eno. 1976. Purification and characterization of the two molecular forms of *Aspergillus oryzae* acid protease. *Biochim. Biophys. Acta* **445**: 194–204.
18. Tsujita, Y. and A. Eno. 1977. Chemical properties of the polysaccharides associated with acid protease of *Aspergillus oryzae* grown on solid bran media. *J. Biochem.* **81**: 1063–1070.

(Received May 12, 1998)