

## 발현유도에 의한 알칼리 소비속도의 감소가 재조합 단백질 생산에 미치는 영향

허 원

강원대학교 공과대학 생물공학과

(접수 : 2005. 10. 13., 게재승인 : 2006. 6. 24.)

## The Dependency of the Expression Level of Recombinant Protein by the Drop of Alkali Consumption Rate after Induction

Won Hur

Department of Bioengineering and Technology, College of Engineering,  
Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea

(Received : 2005. 10. 13., Accepted : 2006. 6. 24.)

IPTG induction caused a sudden drop of alkali consumption rate during cultivation of a recombinant *E. coli* with  $\beta$ -galactosidase structural gene under T7 promoter on a plasmid. A series of batch cultivations showed the positive correlation of the decrease of alkali consumption and the level of expression. However, repeated IPTG induction did not cause any variation of alkali consumption rate. Supplementation of medium even at stationary phase enhanced the level of  $\beta$ -galactosidase expression. These results suggests that the drop of alkali consumption rate by IPTG induction represents the rate of expression.

**Key Words** : Induction, IPTG, metabolic burden, expression, T7 promoter

### 서 론

대장균에서 재조합 단백질이 과량 발현시킬 때 대사적 과부하 (metabolic burden)가 발생하여 세포의 성장 및 생존에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(1). 이와 같은 대사적 과부하는 재조합 미생물의 성장을 저해하거나 경우에 따라 중단시키며(2) 혹은 플라스미드를 소실하거나 유전적인 변이가 발생하여 대사 과부하를 받지 않는 변이주가 모균주보다 빠르게 성장하여 생산성을 약화시키는 경우들이 보고되고 있다(3).

외래 단백질이 과량 생산될 때 발생하는 이와 같은 대사적 과부하는 대장균에서 생산되는 스트레스 단백질을 이용하여 주로 분자 수준에서 확인 되었다. 재조합  $\beta$ -galactosidase를 생성하는 대장균을 배양하는 생물공정에서 IPTG로 발현을 유도시키면 약 30분 후에 heat shock

protein으로 알려져 있는 *DnaK*, *GroEL*, *GroES*의 생성이 증가하는 것이 보고되었다(4). *DnaK*는 열 쇼크 단백질 *Hsp70* 시스템에 속하는 샤프론 (chaperone) 단백질의 하나이며 발현된 재조합 단백질의 접힘 혹은 재접힘에도 관여한다(5). *DnaK* 외에도 대장균이 스트레스를 받으면 발현되는 다른 단백질인 *groEL*, *grpE*, *clpP*, *ftsJ* 등이 재조합 단백질의 과량 발현과 관련된 신호전달 체계 및 상관관계가 PCR을 이용한 전사 프로파일링(6), 2차원 전기영동(7) 및 유전자 칩(8)을 이용하여 확인되었다.

재조합 단백질을 생산하는 대장균을 배양하여 IPTG로 발현을 유도할 때 스트레스 단백질의 발현을 직접적으로 모니터 할 수 있도록 녹색형광 단백질을 코딩하는 유전자를 스트레스 단백질의 유전자의 프로모터와 결합시켜 형광을 측정하여 대사 과부하와 스트레스 단백질의 발현과의 관계도 밝혀졌다(9). 최근에는 재조합 Superoxide dismutase (rhSOD)를 생산하는 대장균에서 Surface plasmon resonance 바이오센서를 이용하여 발현을 유도하면 생성되는 *DnaK* 단백질을 연속적으로 측정하여 rhSOD의 생성을 모니터 할 수 있음을 보고하였다(10)

발효조의 pH 자동제어 신호를 이용하여 알칼리의 소비 속도를 측정하여 재조합 대장균에서 발현 유도에 의하여

† Corresponding Author : Department of Bioengineering and Technology, College of Engineering, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea

Tel : +82-361-250-6276, Fax : +82-361-243-3650

E-mail : wonhur@cc.kangwon.ac.kr

발생하는 스트레스 정도를 측정하는 방법도 보고되었다(11). 이 연구에서는 재조합단백질을 생산하는 대장균을 회분 배양시키고 대수 증식기에 IPTG를 이용하여 발현을 유도시키면 일정 시간 후 알칼리의 소비 속도가 급격하게 감소하는 것이 관찰되었다. 동시에 IPTG의 농도의 변화 및 발현 유도 시점의 변화에 따른 알칼리 소비속도의 감소로 나타나는 스트레스 응답에 대하여 보고하였다. 원래 발효 공정에서 pH 자동 제어는 배양액의 pH를 일정한 값으로 유지하는 목적으로 주로 사용되지만(12) 유가배양이나 연속배양의 경우 배지공급의 조절 지표로도 사용할 수 있도록 개발되었다(13). 뿐만 아니라 pH 자동제어신호를 활용하여 알칼리의 소비속도나 소비량 그리고 완충용량을 온라인으로 모니터링하고 배양상태에 대한 정보를 제공하는 방법도 고안되어있다(14).

따라서 본 연구에서는 알칼리 소비 속도의 변화를 온라인으로 측정하는 방법을 활용하여 IPTG로 발현유도시 발생하는 알칼리 소비속도의 변화로 나타나는 스트레스 응답을 분석하고 어떤 조건에서 스트레스에 응답이 얻어지는 가를 조사하며 동시에  $\beta$ -galactosidase의 발현 미치는 영향에 대하여 조사하고자 한다.

**재료 및 방법**

**사용균주**

본 연구에서는 *Escherichia coli* BL21(DE3)를 pRSET-LacZ로 형질 전환시켜 사용하였다. 플라스미드 pRSET-LacZ (Invitrogen, USA)는 T7 프로모터의 뒤에 lacZ유전자 전체를 포함하여 IPTG를 사용하여  $\beta$ -galactosidase의 발현을 유도할 수 있도록 되어 있다. *Escherichia coli* BL21(DE3)에 pRSET-LacZ으로 형질전환 후 IPTG를 첨가하여 발색하는 콜로니를 여럿 골라서 다시 단일 콜로니를 분리하여 이들 중  $\beta$ -galactosidase의 발현량이 높은 콜로니를 골라 BL21(DE3)-pRS3로 명명하고 사용하였다.

**배양방법**

재조합 단백질 생산시 발현 유도를 모니터링하기 위한 실험에는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/l,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g/l, NaCl 5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  0.4 g/l, Yeast extract 2 g/l, Casamino acid 10 g/l, Glucose 20 g/l를 사용하였다. 모든 배지는 121°C에서 15분간 가압 살균하여 사용하였다. 본 배양에서는 알칼리 소비 속도를 온라인으로 측정할 수 있도록 개량된 5 L 용량의 실험용 발효조 (BK5L, 복성엔지니어링)을 사용하여 실험하였다(14).

**측정 및 분석**

균체량을 측정하기 위하여 UV/Vis Spectrophotometer (Metertek sp-850, UK)를 이용하여 680 nm에서 측정하여 건조 균체량과 OD<sub>680</sub>과의 관계식을 이용하여 환산하였다. 배양액에 잔존하는 포도당의 농도를 측정하기 위하여 환원 당 정량법 (DNS method)을 사용하였다(15). *Escherichia coli* BL21(DE3)에 pRSET-LacZ로 형질전환된 대장균이 발현 유

도되어 생산하는 재조합 단백질인  $\beta$ -galactosidase의 분석은  $\beta$ -galactosidase enzyme assay kit (E200A, Promega, USA) protocol(16)과 Miller protocol(17)을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**알칼리 소비속도 급감과 발현량과의 관계**

대장균 BL21(DE3)-pRS3를 발효조에서 회분식으로 배양하고 대수증식기에 재조합 단백질의 발현을 유도하기 위하여 IPTG를 투입하면 알칼리 소비속도가 급격하게 감소하는 것은 이미 보고되었다(11). 회분 배양에서 IPTG 1 mM을 사용하여 발현을 유도한 예를 보면 IPTG 투입 후에 약 0.2시간 동안은 알칼리 소비 속도가 지속적으로 증가하여 16 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>까지 도달한 후 약 6.7 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>까지 급속하게 감소한 후 다시 서서히 증가하여 10.8 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>로 종결되었다(Fig. 1). 약 0.7 h 동안에 9.3 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>로 감소한 것이다. 반면 배지의 완충용량은 초기의 5.1 meq/pH에서 시작하여 증가하여 6.8 meq/pH까지 증가하다가 IPTG가 투입된 후에 약 0.8시간이 지난 후 감소하기 시작하여 5.62 meq/pH까지 낮아진 후 다소 증가하는 경향을 보이며 종결되었다.

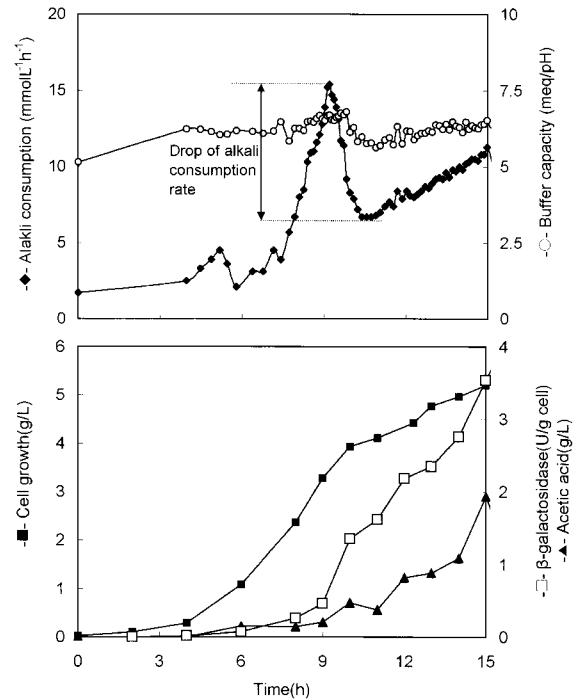


Figure 1. Explain the figure.

알칼리 소비 속도의 감소는 다른 재조합 미생물 시스템에서와 같이 IPTG를 통한 외래 단백질의 과량 발현이 세포내 대사의 변화를 초래하여 발생한 것으로 추정된다. 이것은 알칼리 소비속도의 감소가 IPTG 투입과 동시에 발생하지 않고 단백질의 발현에 소요되는 수십분 정도의 시간 간격을 두고 발생한 점 때문이다. 녹색형광단백질을 이

용하여 *lacZYA* 유전자의 발현은 IPTG를 투입한 후 약 70 분이 소요되는 것으로 보고되었다(17). 뿐만 아니라 감소한 알칼리 소비속도는 다시 회복되는 점도 스트레스 단백질의 일시적 발현과 유사한 양상을 보이고 있다.

따라서 발현유도 후 감소하는 알칼리 소비 속도와 발현량과의 관계를 7회의 회분 배양을 결과로부터 계산하여 그 상관관계를 나타내었다(Fig. 2). 소비속도의 감소가 가장 큰 10.5 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>의 경우 β-galactosidase의 발현량은 960 U/mL 이며 알칼리 소비 속도의 감소가 없었던 회분 배양의 경우에는 약 200 U/mL로 알칼리 소비속도의 감소와 발현량은 비례적 상관관계를 나타내고 있다. 따라서 발현유도 직후의 알칼리 소비 속도의 감소 정도를 알면 β-galactosidase의 발현량을 추정할 수 있음을 알 수 있다. 알칼리의 소비속도의 감소가 없는 경우에도 약 200U/mL의 발현 정도를 나타내는 것은 대장균 숙주 BL21(DE3)의 특징으로 발현유도가 되지 않아도 T7 RNA polymerase가 항상 소량 발현되기 때문이다(18).

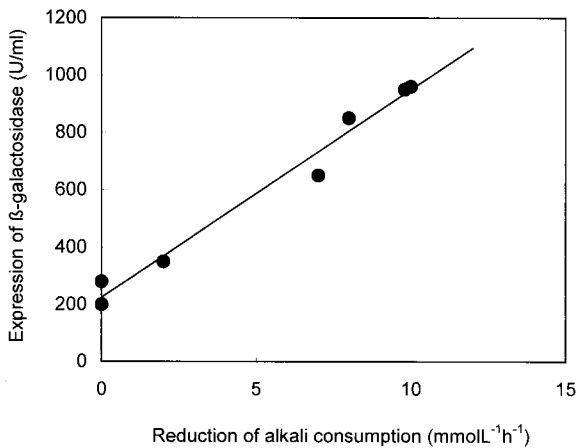


Figure 2. Explain the figure.

재조합 단백질의 발현을 온라인으로 모니터하기 위하여 형광단백질을 같이 발현시키거나(19) 재조합단백질과 퓨전 단백질로 발현시켜(20) 형광프로브로 발현량을 온라인으로 측정하는 방법이 개발되어있다. 그러나 형광 단백질을 사용하는 이 방법은 실제 생산용 재조합 균주에 사용하기에는 장점보다는 단점이 더 많다. *DnaK* 단백질의 발현을 모니터하는 방법도 제시되었으나 SPR 센서를 사용해야 하는 복잡함과 비용이 증가한다는 단점이 있다. 반면에 신뢰도가 높은 pH 센서에서 얻어지는 pH 값과 자동제어 신호로부터 얻어지는 알칼리소비 속도의 온라인 측정은 추가적인 장치의 투입이나, 기기의 보정이나 유지관리와 같은 추가적인 노력이 필요 없으며, 무엇보다도 비용적인 측면에서 유리하다는 장점이 있다.

**발현 제유도 및 배지의 재투입의 영향**

IPTG를 추가로 투입하는 경우에도 최초 IPTG를 투입했을 때와 같이 알칼리 소비속도의 급격한 감소 여부를 확인하기 위하여 동일한 실험조건에서 IPTG를 시간차를 두

고 2회 첨가하였다. 세포의 성장과 함께 알칼리 소비속도는 15.1 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>까지 증가하다가 7.3 hr에 시행한 IPTG 투입으로 인하여 8.8 hr에는 6.3 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>까지 감소한 후 서서히 증가하였다(Fig. 3). 이후 12 hr에 IPTG를 재투입하였으나 최초 투입시 관찰되었던 것과 같은 알칼리 소비속도의 급격한 변화는 관찰되지 않고 10.8 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>까지 지속적으로 증가하였다. 완충 용량은 4.6 meq/pH로 시작하여 세포의 성장과 함께 6.8 meq/pH까지 증가하다가 IPTG로 발현 유도된 후 5.9 meq/pH까지 감소하였다. 그리고 12 hr에 IPTG를 재투입하여도 알칼리 소비 속도의 변화가 없는 것과 마찬가지로 증감의 변화가 관찰되지 않았다.

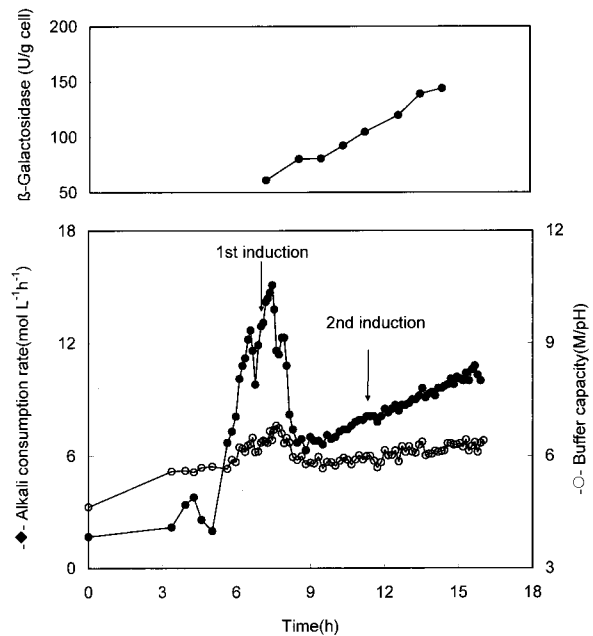


Figure 3. Explain the figure.

배양 시작 후 8 시간에 최초 발현 유도를 하였고 이때 β-galactosidase 발현량은 61.1 units/g cell이였으며 11.5시간에는 92.4 units/g cell까지 증가하였다. 추가로 발현을 유도시킨 후 12.5시간에서의 β-galactosidase 발현량은 104.8 units/g cell이였으며, 2차 발현 유도로 인하여 β-galactosidase 발현량의 급격한 증가는 없었다. 16 시간에는 144.2 units/g cell까지 증가되었다. 따라서 IPTG의 재투입으로 인한 알칼리 소비속도의 감소와 발현량의 급격한 증가는 관찰되지 않았다. 이것은 최초의 IPTG가 발현을 유도하는데 충분하거나 혹은 다른 요인 예를 들어 β-galactosidase의 생합성 필요한 기질의 공급이 제한되어 있는 것으로 설명될 수 있다. 이를 확인하기 위하여 배지를 추가로 투입할 경우 발현량의 변화 여부를 확인하는 회분배양을 동일한 조건에서 실시하였다.

발현 유도 후 탄소원인 포도당이 고갈되어 pH가 상승하는 것을 신호로 배지를 재공급하고 동시에 알칼리 소비속도와 완충용량의 변화를 온라인으로 측정하였다(Fig. 4). 알칼리 소비속도는 세포의 대수적 증식과 함께 16.1 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>까지 계속 증가하였고 배양 시점 7.3시간에 IPTG

0.1 mM을 투입한 후 약 1 hr 동안 6.9 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>까지 급격하게 감소하였다. 이후 다시 서서히 증가하기 시작하여 16시간에는 11 mmolL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>에 도달하였으며 동시에 포도당의 고갈을 나타내는 pH의 급격한 증가가 관찰되었다. 이때 배지 1 L 당 10 g glucose, 1.2 g yeast extract, 5.6 g casamino acid를 첨가하였다. 배지의 재공급 후에도 알칼리의 소비속도는 계속 증가하는 경향을 보여주었다. 반면 완충용량은 투입된 배지의 영향으로 계단식으로 증가한 후 지속적으로 서서히 증가하였다. IPTG 발현유도로 β-galactosidase 발현량은 7.5시간에 42.7 units/g cell에서 15시간에는 114 units/g cell까지 증가하였다. 그러나 β-galactosidase의 발현량은 배지의 재공급으로 인하여 114 units/g cell에서 157 units/g cell로 급격히 증가하였으며 17.9 hr에는 191 units/g cell까지 발현되었다.

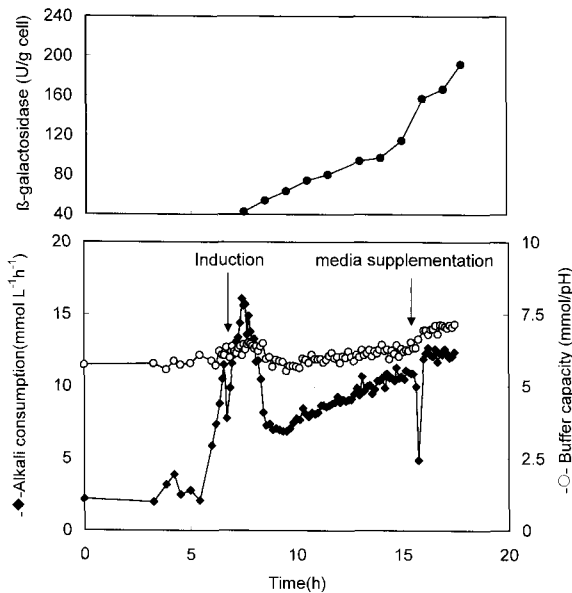


Figure 4. Explain the figure.

따라서 배지의 재공급으로 인한 알칼리의 소비속도와 완충용량의 변화보다 β-galactosidase의 발현의 급격한 증가를 확인할 수 있었다. 이것은 IPTG를 이용한 발현유도는 1 회로서 충분하여 T7 프로모터의 발현에 필요한 기작들이 작동하고 있으나 기질의 공급이 발현을 제한하는 것으로 확인할 수 있다.

**질소원의 효과**

발현유도 후 발생하는 급격한 알칼리소비 속도의 감소는 배지의 주요 질소원이며 중성영역에서 이온화된 상태로 존재하는 casamino acid가 세포내로 흡수되는 과정에서 발생하였을 가능성이 있다. 따라서 casamino acid를 다른 질소원인 Yeast extract로 바꾼 후 동일한 조건에서 회분배양을 진행하면서 발현유도 후 급격한 알칼리 소비속도의 감소가 관찰 되는가를 측정하였다. 세포의 대수 증식기에 IPTG를 투입하여 발현을 유도하였으나 알칼리 소비속도의 급격한 감소는 관찰되지 않았다. 이와 같은 현상은 발현

유도 후 알칼리 소비속도의 급격한 감소는 아미노산의 흡수와 관련되었을 가능성을 제시하고 있다. Casamino acid는 우유 단백질을 산분해하여 얻어진 아미노산이 주성분이다. 따라서 발현이 유도되어 세포내 아미노산이 고갈되어 외부의 아미노산을 빠른 속도로 흡수하게 되는 것과 유관할 것으로 예상된다.

**요약**

대장균을 회분배양하면서 알칼리소비속도를 온라인으로 모니터링하고, 대수증식기에 IPTG로 재조합 단백질의 발현을 유도시키면 알칼리소비속도가 급격하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 회분배양을 서로 다른 조건에서 7회 실시하고 β-galactosidase의 발현량과 발현유도 직후 알칼리 소비속도의 감소를 비교하여 알칼리소비의 감소가 클수록 발현량이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 IPTG를 재투입하여도 발현량은 증가하지 않았고 배지를 추가로 공급하면 발현량이 증가한다는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로부터 외래단백질의 발현속도는 초기의 IPTG 투입시 결정되고 이후의 재조합단백질의 생산은 배지의 공급에 의하여 제한된다고 판단할 수 있다. 이와 같은 알칼리 소비속도는 Casamino acid를 질소원으로 사용할 경우 관찰 되었으나 Yeast extract를 유일한 탄소원으로 사용할 경우에는 관찰되지 않았다.

**REFERENCES**

1. Ellis, R. J. (2001), Macromolecular crowding: obvious but under appreciated, *Trends Biochem. Sci.* **26**, 597-604.
2. Bentley, W. E., N. Mirjalili, D. C. Anderson, R. H. Davis, and D. S. Kompala (1990), Plasmid encoded protein: the principal factor of 'metabolic burden' associated with recombinant bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 668-681.
3. Glick, B. R. (1995), Metabolic load and heterologous gene expression, *Biotechnol. Adv.* **13**, 247-261.
4. Kosinski, M. J., U. Rinas, and J. E. Bailey (1992), Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 782-784.
5. Lilie, H., E. Schwarz, and R. Rudolph (1998), Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 497-501.
6. Gill, R. T., J. J. Valdes, and W. E. Bentley (1999), Reverse transcription PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock, *Appl. Environ. Microb.* **65**, 5386-5393.
7. Jurgen, B., H. Y. Lin, S. Riemschneider, C. Scharf, P. Neubauer, R. Schmidt, M. Hecker, and T. Schweder (2000), Monitoring of genes that respond to over production of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations, *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 217-224.
8. Zheng, M., X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa, and G. Storz (2001), DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide, *J. Bacteriol.* **183**, 4562-4570.

9. Cha, H. J., R. Srivastava, V. M. Vakharia, G. G. Rao, and W. E. Bentry (1999), Green fluorescent protein as a noninvasive stress probe in resting *Escherichia coli* cells, *Appl. Environ. Microb.* **65**, 409-414.
10. Vostiar, I., J. Tkac, and C. F. Mandenius (2004), Off-line monitoring of bacterial stress response during recombinant protein production using an optical biosensor, *J. Biotechnol.* **11**, 191-201.
11. Hur, W. and Y. K. Chung (2005) On-line monitoring of IPTG induction for recombinant protein production using an automatic pH control signal, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **10**, 304-308.
12. Schügerl, K. (1991), Common Instruments for Process Analysis and Control, In *Biotechnology Vol. 4*, H. J. Rehm, G. Reed, A. Puhler and P. Stadler Eds., p6-25, 1991, VCH Publishers Inc., New York.
13. Suzuki T., T. Yamane, and S. Shimizu (1990), Phenomenological background and some preliminary trials of automated substrate supply in pH-stat model fed-batch culture using a set point of high limit, *J. Ferment. Bioengin.* **69**, 292-297.
14. Chung Y. K. and W. Hur (2000), A new method of measuring of buffer capacity and alkali consumption rate of a fermentation process, *J. Bioscience. Bioeng.* **90**, 580-582.
15. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reduction sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426.
16. Miller, J. H. (1972), Experiments in molecular genetics, 2nd ed., p128, Cold Spring Harbor, New York.
17. Zaslaver, A., A. E. Mayo, R. Rosenberg, P. Bashkin, H. Sberro, M. Tsalyuk, M. G. Surette, and U. Alon (2004), Just-in-time transcription program in metabolic pathways, *Nature Genetics* **36**, 486-491.
18. Studier, F. and B. Moffatt (1986), Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
19. Albano, C. R., L. Randers-Eichhorn, W. E. Bentley, and G. Rao (1998), Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production, *Biotechnol. Prog.* **14**, 350-354.
20. Jones J. J., A. M. Bridges, A. P. Fosberry, S. Gardner, R. R. Lowers, R. R. Newby, P. J. James, R. M. Hall, and O. Jenkins (2004), Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins, *J. Biotechnol.* **109**, 201-211.