

## 배지최적화를 통한 재조합 바실러스 서브틸리스에서 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 유래 $\gamma$ -글루타밀펩타이드전달효소의 대량생산

조혜빈 · 제텐드라 쿠마르 로이 · 박우진<sup>1</sup> · 전병운<sup>1</sup> · 김영완\*

고려대학교 과학기술대학 식품생명공학과, <sup>1</sup>(주)농심 중앙연구소

### Overproduction of a $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens* in *Bacillus subtilis* through medium optimization

Hye-Bin Cho, Jetendra Kumar Roy, Wu-Jin Park<sup>1</sup>, Byoung-Oon Jeon<sup>1</sup>, and Young-Wan Kim\*

Department of Food and Biotechnology, Korea University  
<sup>1</sup>R&D Center, Nongshim Co.

**Abstract**  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT, EC 2.3.2.2) transfers  $\gamma$ -glutamyl moiety from glutamine to amino acids or peptides and hydrolyzes glutamine to glutamate and ammonia. In order to overproduce  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens* (BAGGT), the encoding gene was cloned and expressed in *Bacillus subtilis*. The productivity of BAGGT in *Bacillus subtilis* was improved by 42-fold by using a dual-promoter system that was generated by combining promoters from *B. subtilis*  $\alpha$ -amylase and BAGGT genes. Through optimization of medium composition by Plackett-Burman design and central composition design, BAGGT was produced at  $18.3 \times 10^7$  U/L of culture in the optimized medium. Compared to previously used Luria-Bertani medium, the optimized culture medium (15 g/L molasses, 60 g/L corn steep liquor, 6 g/L yeast extract, 4 g/L NaCl, 6 g/L  $K_2HPO_4$ , and 2 g/L  $KH_2PO_4$ ), resulted in a 4.3-fold increase in production of BAGGT.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, dual-promoter system,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, medium optimization

## 서 론

$\gamma$ -글루타밀펩타이드전달효소( $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, GGT, E.C. 2.3.2.2)는 글루타치온(glutathione)의 대사에 관여하는 효소이며, 미생물부터 포유류에 이르기까지 자연계에 광범위하게 존재한다(1). GGT는 60 kDa 크기의 폴리펩타이드(polypeptide)가 비활성형 전구체 단백질로 생합성되며, 자가분해(autocleavage)를 통해 약 40 kDa와 20 kDa 크기의 단량체(subunit)가 이황화결합(disulfide bond)에 의해서 연결되어진 헤테로다이머(heterodimer)의 형태로 전환되면서 활성화된다(2-4).

GGT의 작은 단량체(small subunit)의 N-말단에 존재하는 트레오닌(threonine) 잔기가 기질인 글루타민(glutamine)의 결사슬에 존재하는  $\gamma$ -카보닐기(carbonyl group)와 반응하여  $\gamma$ -글루타밀-효소 공유결합 중간체(covalent  $\gamma$ -glutamyl-enzyme intermediate)를 형성한다. 이 중간체와 아민류, 아미노산, 및 짧은 펩타이드의  $\alpha$ -아미노기가 반응하면서 중간체의-글루타밀기가 전이되는  $\gamma$ -글루타밀 전달 반응이 일어난다. 이와 함께 중간체의  $\gamma$ -글루타밀기는 물 분자의 수산기로 전이될 수도 있는데 이 경우는 글루타민이 가수

분해되어 글루탐산(glutamate)과 암모니아로 분해된다(3,5). GGT의  $\gamma$ -글루타밀 전이활성을 통해 새로운  $\gamma$ -글루타밀 펩타이드( $\gamma$ -glutamyl peptides)를 합성할 수 있으며 이를 통해 고쿠미(kokumi) 성분의 글루타밀 펩타이드(6,7) 또는 차(tea)의 감칠맛(umami) 성분인 L-테아닌(L-theanine)의 효소적 합성에 이용된다(8,9). 또한 GGT의 글루타민 가수분해 활성은 글루타민을 글루탐산으로 전환할 수 있으므로 정미성 소재 생산에 적용되고 있다(10,11).

재조합 기술을 통해 대량생산된 효소의 경우 식품용 효소로 사용하기 위해서는 안전에 대한 문제가 대두된다(12). 식품용 효소의 안전성 문제의 주요 사항중의 하나는 숙주세균으로 사용되는 미생물에 대한 안전성 문제이며, 이를 해결하기 위해서 보편적으로 안전성이 보장된(Generally Recognized As Safe, GRAS) 미생물을 숙주세균으로 이용한다. GRAS급 미생물 중 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)는 성장속도가 빠르며 재조합 단백질을 배양액으로 분비할 수 있어서 다양한 식품용 효소를 생산하는데 사용되고 있다(13). *B. subtilis*의 경우 형질전환율이 낮아서 직접 외래 유전자를 클로닝하는데 어려움이 있어서 대장균(*Escherichia coli*)과 함께 사용할 수 있는 셔틀벡터(shuttle vector)를 제작하여 클로닝과 발현을 위해 사용하고 있다(14-17). 재조합 단백질의 대량생산을 위해서는 벡터 시스템 개발과 더불어 유전자의 발현을 높일 수 있는 프로모터(promoter)의 개발이 중요하다. *B. subtilis*에서 재조합 단백질 대량 생산을 위한 다양한 프로모터 개발 및 이를 장착한 발현용 플라스미드에 관한 연구가 진행되었다(13). 최근 항시발현 프로모터(constitutional promoter) 2개를 연속적으로 배치한 이중프로모터 시스템을 이용하여 1개의 프로모터만을

\*Corresponding author: Young-Wan Kim, Department of Food & Biotechnology, Korea University, Sejong, 30019, Korea  
Tel: +82-44-860-1436  
Fax: +82-44-860-1586  
E-mail: ywankim@korea.ac.kr  
Received July 31, 2017; revised August 14, 2017;  
accepted August 14, 2017

사용하는 단일프로모터 시스템에 비해 외래 유전자를 과발현하는 방법이 *B. subtilis*에 적용된 다수의 연구결과가 보고되었다(16,18). 재조합 미생물을 이용한 효소의 생산에 있어서 유전적 요인도 중요하지만 발효에 사용되는 배지 내 조성이 세포 성장 및 효소의 생산성에 지대한 영향을 미친다. 균체 및 효소를 포함하는 대사산물의 생산성 향상을 위한 수 많은 배지 최적화 연구가 진행되었으며, 다양한 인자를 최적화하기 위한 표면반응분석을 통한 통계적 최적화 방법이 주로 활용되고 있다(19-21).

본 연구에서는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*B. amyloliquefaciens*) S0904 유래 GGT (BAGGT)를 *B. subtilis*에서 대량생산하는 것을 목적으로 유전자 과발현을 위한 이중프로모터 시스템 구축과 통계적 최적화를 통해 재조합 GGT생산을 위한 배지조성을 결정을 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

배지성분은 Difco Laboratories (Detroit, MI, USA)에서 구매하였으며, 당밀(molasses)과 옥수수 침지농축액(corn steep liquor, CSL)은 (주)대상(Incheon, Korea)에서 공급받았다. 제한효소는 Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 기타 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 미생물 및 플라스미드

BAGGT를 생산하는 야생형 *B. amyloliquefaciens* S0904는 국내 전통 된장에서 분리되었으며 (주)농심에서 분양 받아 사용하였다(22). 유전자 클로닝은 *E. coli* MC1061 [F<sup>-</sup>, *araD139*, *recA13*,  $\Delta$ (*araABC-leu*)7696, *galU*, *galK*,  $\Delta$ *lacX74*, *rpsL*, *thi*, *hsdR2*, *mcrB*] 를 숙주세균으로 사용하였으며, 재조합 BAGGT 생산은 *B. subtilis* LKS87 [DB104, *amyE*, *his*<sup>+</sup>, *nprR*<sub>2</sub>, *nprR*<sub>12</sub>,  $\Delta$ *aprA*<sub>3</sub>]을 숙주세균으로 사용하였다. *B. subtilis*로의 형질전환 및 유전자 발현을 위한 벡터는 *E. coli* - *B. subtilis* 셔틀벡터인 pUBRTA 벡터(23)를 사용하였다. 야생형 *B. amyloliquefaciens* S0904 및 *B. subtilis*로부터 BAGGT를 생산하는 배지는 Luria-Bertani (LB)배지(10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl) 에 카나마이신(kanamycin)을 20 µg/mL 첨가하여 사용하였으며, 진탕교반 배양기(JSSI-300CL, JSR Research Co., Gongju, Korea)를 사용하여 37°C, 250 rpm에서 배양하였다.

### BAGGT 유전자 클로닝 및 *B. subtilis* 발현용 플라스미드 제작

중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통한 BAGGT 유전자의 증폭을 위해서 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946의 유전체(NCBI accession No. YP\_005130588) 상에 존재하는 GGT 유전자(NCBI accession No. WP\_031379060) 주변의 DNA 염기서열을 바탕으로 프로모터 부위를 포함하는 유전자 부위의 증폭을 위한 상류 프라이머(flakBAGGT-Nde-Fw, 5'-GCT-CACGTTCCCTTCATATGTCATGTGAGTGAA-3', NdeI 제한효소자리 밑줄)와 하류 프라이머 (flakBAGGT-Xho-Rv, 5'-CACTCATC-CTCGAGCAGTGCAGAATAAACA-3', XhoI 제한효소자리 밑줄)를 설계하였다. *B. amyloliquefaciens* S0904의 염색체를 QIAamp<sup>TM</sup> genomic DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 분리한 후, 이를 주형으로 하여 ExTaq polymerase (Takara, Tokyo, Japan)를 이용한 PCR을 통해 BAGGT 유전자를 증폭하였다. 증폭된 BAGGT 유전자를 pCR-4-TOPO 벡터(Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA)에 라이게이션(ligation) 한 후 *E. coli*에 형질전환 하고, Hybrid-Q<sup>TM</sup> Plasmid Rapidprep kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 재조합 플라스미드를 분리하였다. 항생제 내성과 제한효소 처리를 통해서 BAGGT유전자가 삽입된 pCR-BAGGT를 제작하였다. pCR-BAGGT를 NdeI과 XhoI으로 절단하여 GGT유전자의 프로모터(*ggfR*)와 효소 암호화 구역(coding region)을 포함하는 DNA 단편을 Expin<sup>TM</sup> Gel SV kit (GeneAll Biotechnology)를 이용하여 회수하였다. *B. subtilis* NA64 유래 α-아밀레이스 유전자의 프로모터인 *amyR2* 프로모터를 장착한 pUBRTA 벡터(16)를 동일한 제한효소로 처리한 후 회수한 DNA를 삽입하여 pUBRTAG-BAGGT 플라스미드를 제작하였다. BAGGT 유전자의 프로모터만을 가진 단일프로모터 시스템 제작을 위해서 pUBRTAG-BAGGT를 XbaI과 NdeI으로 절단하여 *amyR2* 프로모터를 제거한 후 T4 DNA 중합효소(New England Biolabs, Ipswich, MA USA) 처리를 통해 양 말단을 평활단면(blunt end)화 한 후, 라이게이션을 통해 pUBRTG-BAGGT를 제작하였다.

### *B. subtilis*에서 BAGGT 생산

Sadaie와 Kada의 방법(24)을 이용하여 재조합 플라스미드를 *B. subtilis*에 형질전환하였다. 형질전환체를 카나마이신(20 µg/mL)이 함유된 LB 배지에 접종하여 전배양 한 후 500 mL의 동일한 배지에 재접종한 후 37°C, 250 rpm에서 24시간 내지 48시간 동안 배양하여 BAGGT를 생산하였다. 배양기간 동안 배양액을 취하여 UV/vis 분광광도계(spectrophotometer)(Lambda 35, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 흡광도(optical density)를 600 nm에서 측정하여 균체 성장을 모니터링 하였다. 배지 최적화 과정에서 효소활성은 배양액을 원심분리(4°C, 10,000 rpm, 10 min, VS-5500CFi, Vision Scientific Co., Daejeon, Korea)하여 회수한 배양상등액을 이용하여 측정하였다.

### BAGGT 효소활성 측정

BAGGT 생산성 확인을 위한 효소 활성 측정은 BAGGT가 가지는 글루타민 가수분해 활성을 기반으로 분석하였다. 발색기질인 감마-L-글루타미드-p-니트로아닐리드(γ-L-glutamyl-p-nitroanilide, pNA-Glu, Sigma-Aldrich)를 0.1 mM 함유한 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0)을 이용하여 최종 부피 200 µL의 효소반응액을 55°C에서 10분간 반응한 후 20 µL 3.5 N 아세트산(acetic acid)을 첨가하여 반응을 정지하였다. 각 반응액에서 200 µL를 96-well plate로 옮긴 후 VersaMax<sup>TM</sup> 평판판독기(plate reader) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 410 nm에서 유리된 p-나이트로아닐린(p-nitroaniline)의 양을 측정하였다. BAGGT의 1 유닛(unit)은 1분 당 pNA-Glu로부터 1 mole의 p-nitroaniline을 유리시키는 효소량으로 결정하였다

### 질소원, 탄소원, pH 및 염류에 의한 BAGGT 생산성 비교

탄소원은 포도당, 설탕(sucrose), 당밀, 글리세롤(glycerol)을 사용하였으며, LB 배지에 10 g/L의 농도로 첨가하였다. 질소원의 경우 LB 배지의 경우 트립톤(tryptone)을, 그 외 배지에서는 트립톤 대신 펩톤(peptone), 폴리펩톤(polypeptone), 소이톤(soytone), 및 CSL로 대체하였으며, 농도는 동일하게 10 g/L로 하였다. 250 mL 베플 플라스크(baffled flask)에 배지 20 mL을 담고 전배양액을 1% (v/v)으로 접종한 후 37°C, 250 rpm에서 48시간 배양하였다. 초기 pH의 경우 인산이수소포타슘(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)과 인산수소포타슘(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)을 혼합 첨가하여 초기 pH를 6.5 내지 8 범위로 조정 후 사용하

였다. 첨가된 인산염의 양은 결과 및 고찰 부분에 서술하였다. 효소 생산성에 대한 염류의 영향을 알아보기 위하여  $K_2HPO_4$ 와  $KH_2PO_4$  혼합분말(각각 15 및 5 g/L 또는 30 및 10 g/L, 이하 인산염으로 통칭),  $MgSO_4$  (1 g/L) 및  $(NH_4)_2SO_4$  (2 g/L)를 배지에 첨가한 후 동일한 조건에서 배양하여 효소 생산성을 비교하였다.

### Plackett-Burman 계획법

배지 성분 중 GGT 생산에 중요한 인자를 선별하기 위해서 Plackett-Burman 계획법(Plackett-Burman design, PBD)을 실시하였다(19). 5개의 배지성분(당밀, CSL, 효모추출물, NaCl, 인산염)을 변수로 하여 2 단계의 농도를 정하고, 총 12개의 실험구를 Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA)을 이용하여 설계하였다. 당밀( $X_1$ ), CSL ( $X_2$ ), 효모추출물( $X_3$ ), NaCl ( $X_4$ ), 인산염( $X_5$ )의 저농도 및 고농도는 다음과 같이 설정하였다: 당밀, 8, 12 g/L; CSL 24, 35 g/L; 효모추출물 4, 6 g/L; NaCl, 4, 6 g/L; 인산염( $K_2HPO_4$  +  $KH_2PO_4$ ) 8 (6+2), 12 (9+3) g/L. 모든 배양은 250 mL 베폴 플라스크에 배지 20 mL을 담고 전배양액을 1%(v/v)으로 접종한 후 37°C, 250 rpm에서 48시간 배양하였다. 세번의 독립된 실험의 평균값을 t-test 분석을 통해서 유효한 인자를 선별하였다.

### 중심합성계획법

주요인자로 선정된 당밀과 CSL의 농도 최적화를 위해 중심합성계획법(central composite design, CCD)을 이용하였다(19), 실험 계획은 BAGGT 생산을 위한 주요 변수인 당밀 농도( $X_1$ , 14.4-25.6 g/L)과 CSL ( $X_2$ , 36-64 g/L)을 -1.41421, -1, 0, +1, and +1.41421의 5단계로 부호화하여 중심합성계획법에 따라 MiniTab (Minitab Inc.)을 이용하여 13개 실험구를 설계하고 배양하였다. 아래의 식에 대한 회귀분석을 통해 모델식을 결정하였다.

$$Y \text{ (예측 효소 활성)} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

## 결과 및 고찰

### *B. subtilis*를 숙주세균으로 한 BAGGT 유전자의 발현

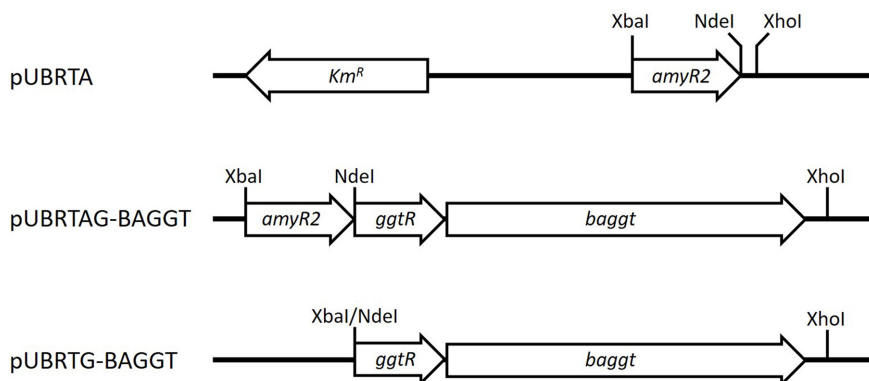
*B. subtilis*에서 재조합 GGT 생산을 생산함에 있어서 GGT 유전자에서 유래한 프로모터(*ggtR*)를 단독으로 사용한 발현시스템과 *B. subtilis* NA64유래  $\alpha$ -amylase의 프로모터인 *amyR2* 프로모터(25)와 *ggtR*로 구성된 이중 프로모터를 이용하는 시스템인 pUBRTG-BAGGT와 pUBRTAG-BAGGT를 각각 제작하였다(Fig.

1). 각 재조합 플라스미드를 *B. subtilis* LKS87에 형질전환한 후, LB 배지에서 배양하였다. GGT의 N-말단에 존재하는 signal peptide의 작용으로 재조합 GGT는 배양액으로 분비되었으며, 세포 내에서는 활성이 검출되지 않았다(Data not shown). 단일프로모터 시스템을 이용한 재조합 *B. subtilis*의 경우, 동일조건에서 배양한 야생형 *B. amyloliquefaciens*의 효소생산성인 배양액 1 L 기준  $90.2 \times 10^4$  U보다도 못한  $60.5 \times 10^4$  U의 효소 생산성을 보였다. 반면, 이중프로모터의 경우 야생형 균주 대비 약 42배의 향상된 효소생산성(배양액 1 L 기준  $3.8 \times 10^6$  U)을 나타냈다(Fig. 2A). 이중프로모터를 이용한 BAGGT의 생산성 향상은 SDS-PAGE를 통해서도 확인할 수 있었으며, 기존 논문에 보고된 바와 같이 50 kDa와 20 kDa의 두 개 subunit이 검출되었다(Fig. 2B). 단일프로모터로서 *amyR2* 프로모터에 의한 발현을 비교하기 위해 pUBRTA 벡터로 BAGGT 유전자만의 클로닝을 시도하였으나, *B. subtilis* 형질전환체를 얻을 수 없었다(Data not shown). 이는 해당 재조합 플라스미드가 *B. subtilis* 내에서 안정하게 유지되지 못하기 때문인 것으로 예상된다. 이상의 결과를 바탕으로 이중 프로모터 시스템을 장착한 pUBRTAG-BAGGT를 BAGGT 발현시스템으로 선정하였으며, 이후 실험에 이용하였다.

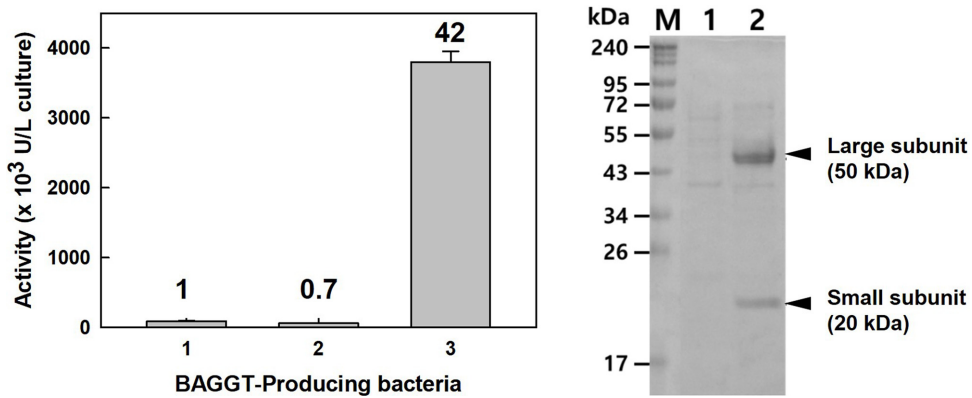
### 탄소원 및 질소원의 선정

재조합 플라스미드 pUBRTAG-BAGGT가 형질전환된 *B. subtilis*를 배양하면서, LB 배지 내 탄소원 첨가 혹은 질소원 대체를 통한 효소 생산성의 변화를 관찰하였다. 탄소원을 추가로 LB 배지에 첨가하였을 경우 다른 탄소원은 오히려 감소하였으나, 당밀을 첨가한 배지에서 1.5배의 효소 생산성이 향상되었다(Fig. 3A). 특이한 사항은 sucrose와 glycerol의 경우는 24시간 배양 후 최종 pH가 5 이하로 떨어졌으나, 당밀을 사용한 경우 오히려 pH가 8.9까지 증가하였다. 이와 같은 발효 후반 pH의 증가의 원인은 생산된 GGT에 의해서 배지 내 글루타민이 분해됨에 따라 산물로 나온 암모니아가 배지의 pH를 올렸기 때문으로 예측하였다.

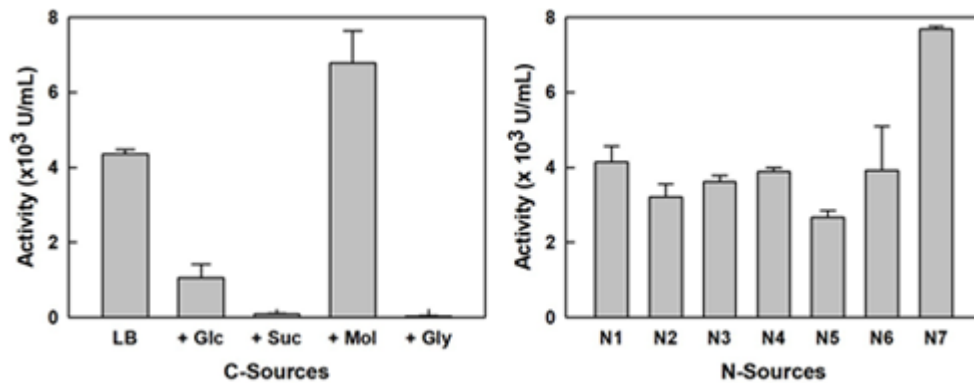
질소원의 경우 LB 배지가 최대의 생산성을 보였으며, 트립톤을 대체하기 위해 다른 질소원이 첨가된 배지의 경우 LB 배지 대비 64-95% 수준이었으며, 효소 생산성에 대한 질소원의 영향은 트립톤>소이톤>폴리펩톤>펩톤>CSL 순이었다. CSL의 경우 사용한 질소원들 중 가장 낮은 생산성을 보였는데, 이는 액상의 CSL을 동량의 무게로 첨가하여 실제 질소원의 양이 다른 것들에 비해 적었을 것으로 판단되었다. 실제로 CSL의 농도를 늘려주면 BAGGT의 생산성이 증가하였으며, 30 g/L 조건에서 LB 배



**Fig. 1. Expression systems for BAGGT gene in *B. subtilis*.** pUBRTA, a shuttle vector for *E. coli* and *B. subtilis* (24); *amyR2*, promoter of *amyE+* from *B. subtilis* NA64(26); *ggtR*, promoter of BAGGT gene; *baggt*, structural gene for BAGGT;  $Km^R$ , kanamycin resistance gene



**Fig. 2. (A) Production of BAGGT and (B) SDS-PAGE analysis of the culture supernatant.** Wild type *B. amyloliquefaciens* S0904 (bar 1), *B. subtilis* harboring pUBRTG-BAGGT (bar 2), and *B. subtilis* harboring pUBRTAG-BAGGT (bar 3). The values above the bars represent the relative productivities of the corresponding systems, Lane M, size marker; lane 1, culture supernatant of *B. subtilis* harboring pUBRTG-BAGGT; lane 2, culture supernatant of *B. subtilis* harboring pUBRTAG-BAGGT.



**Fig. 3. Effects of C-sources and N-sources on BAGGT production in *B. subtilis* harboring pUBRTAG-BAGGT.** (A) LB, LB-medium; +Glc, LB+1% glucose; +Suc, LB+1% sucrose; +Mol, LB+1% molasses; +Gly, LB+1% glycerol, (B) N1, 1% Tryptone; N2, 1% peptone; N3, 1% polypeptone; N4, 1% soytone; N5, 1% CSL; N6, 2% CSL; N7, 3% CSL.

지 대비 180배 가량 생산성이 증가하였다 (Fig. 3B). 비용면에서도 CSL이 다른 질소원에 장점을 가지므로 산업적 대량 생산에 적합한 질소원으로 판단하고, CSL의 BAGGT 생산을 위한 질소원으로 결정하였다.

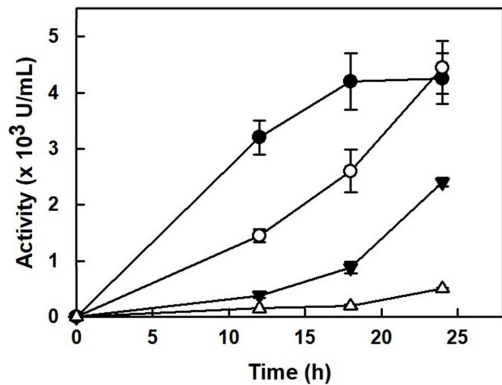
**GGT 생산에 미치는 초기 pH의 영향**

탄소원 첨가 실험에서 sucrose와 glycerol이 첨가된 배지의 경우 미생물의 성장은 LB와 크게 다르지 않았으나, 효소 생산성은 매우 떨어졌다(Fig 3A). 해당 배지의 경우 최종 pH가 5 이하인 반면, BAGGT 생산성이 LB 배지 대비 50% 이상인 배지의 최종 pH는 8보다 높았다(Data not show). 배지의 염기성 pH가 효소의 생산성이 영향을 줄 것으로 판단하고, 배지의 초기 pH에 따른 효소 생산성을 비교하고자 하였다. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 양을 조정하여 LB 배지의 초기 pH를 7.1, 7.4, 및 7.9로 맞추었다. 하지만 배지의 높은 초기 pH는 발효 중 효소생산성을 저해하였다(Fig. 4). LB 배지의 경우 초반 BAGGT의 생산성이 가장 높았으며 18시간이 지나면서 BAGGT의 생산이 더 이상 증가하지 않았다. 반면, 인산염이 첨가된 배지에서는 초기 pH가 높을수록 발효 초반 효소 생산성이 LB 배지에 비해 더욱 낮았다. 이후 효소생산이 증가하여 pH7.0에서 시작한 경우는 24시간 지점에서 효소 생산성이 LB 배지와 동일하게 증가하였다. 이러한 결과부터 염기성 배지에서의 발효는 BAGGT 생산에 유리하지 않은 것으로 판단

하였다. 하지만 인산염은 DNA의 생산을 비롯해서 미생물 세포 벽에 존재하는 인지질을 형성하는데 요구되는 물질로서 대량 발효에서 인산염의 부족으로 인해 균체 성장이나 효소 생산이 저해될 수 있으므로 대량 발효과정에서 반드시 첨가되어야 하는 물질이다(21,26). 따라서 이후 실험에서는 초기 pH를 6.5로 맞추어 있는 인산염을 첨가하였으며, 이 후 최적화를 통해 인산염의 첨가량을 결정하였다.

**GGT 생산에 미치는 염류의 영향**

배지 최적화에 있어서 염류 및 미네랄의 중요한 영향을 미친다(26). 암모늄염 주요 무기성 질소공급원으로 효소생산용 배지에 사용되며, 인산염과 마그네슘염은 DNA의 합성에 관여하므로 최적적화를 통한 균체 성장속도 향상에 필수적인 염류로 분류된다. 인산염의 경우 앞선 실험결과를 바탕으로 초기 pH를 pH 6.5로 맞추기 위해서 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 비율을 3:1로 하여 총 인산염을 20 g/L 첨가하였으며(Fig. 5, M1), 황산암모늄((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)과 MgSO<sub>4</sub>는 1 및 2 g/L의 농도로 첨가하였다(Fig. 5, M2, M3). M4 배지는 M3 배지의 인산염의 농도를 2배로 증가한 배지를 사용하였다. 앞선 결과와 마찬가지로 LB 배지의 경우 12시간 이후 효소 생산성이 더 이상 증가하지 않았으나, 다른 배지에서는 효소 생산성이 꾸준히 증가하였다. 48시간 배양 후 효소 생산성을 비교하면 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 MgSO<sub>4</sub> 및 2배 농도의 인산염의 첨가한



**Fig. 4. Effect of phosphate salts on BAGGT production in *B. subtilis* harboring pUBRTAG-BAGGT.** Closed circle, LB medium; open circle, LB medium containing  $K_2HPO_4$  and  $KH_2PO_4$  of 4.58 and 16.36 g/L to adjust initial pH 7.1; closed triangle, LB medium containing  $K_2HPO_4$  and  $KH_2PO_4$  of 1.92 and 22.53 g/L to adjust initial pH 7.6; open triangle, LB medium containing  $K_2HPO_4$  and  $KH_2PO_4$  of 0.64 and 25.41 g/L to adjust initial pH 7.9

배지에서는 추가적인 염류를 첨가하지 않은 M1 배지에 비해 효소 생산성이 모두 낮았다. 최대 활성을 보인 M1 배지의 성분인 당밀, CSL, 효모추출물, NaCl 및 인산염을 이후 최적화를 위한 인자들로 결정하였으며, 배양시간을 48시간으로 조정하였다.

#### 배지최적화를 위한 주요 인자 선별

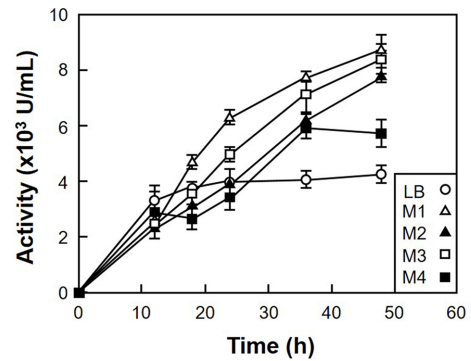
최적화 과정에서 배지 성분 중 유효한 주요 인자를 선별하기 위해서 앞선 실험에서 결정한 5개의 인자들에 대하여 PBD 방법을 이용하여 12개 실험조건을 설계하였다. 인산염의 경우 pH를 6.5로 유지하기 위해서  $K_2HPO_4$ 와  $KH_2PO_4$ 의 비율을 3:1로 유지하였으며, 효소 생산에 대한 부정적 영향을 감안하여(Fig. 5, M4), 인산염의 농도를 8 및 12 g/L로 낮추어 저농도 및 고농도를 설정하였다. 각 실험의 조성 농도와 BAGGT의 활성은 Table 1에 나타났다. BAGGT의 효소 생산성은 배양액 1 mL 당  $6.46\text{--}11.3 \times 10^3$  U 이었다. PBD 분석을 통해서 각 변수의 효과를 평가한 결과, 당밀과 CSL의 경우  $p$ -값이 각각 0.0047과 0.0046로 유의인자로 분류하였다(Table 2). 반면 그 외 인자들은  $p$ -값이 0.05보다 큰 값이어서 상대적으로 영향이 적은 인자로 분류하였으며, 이 중 효모추출물은 긍정적 효과를, NaCl과 인산염은 부정적 효과를 나타내었다. 이후 최적화를 위한 인자로는 영향력이 큰 당밀과 CSL을 선정하였고, 다른 인자들 중 긍정적 효과를 보인 효모추출물은 고농도인 6 g/L로 하고, 부정적 효과를 보인 NaCl과 인산염은 저농도인 4 및 8 g/L( $6\text{ g/L } K_2HPO_4 + 2\text{ g/L } KH_2PO_4$ )로 각각 결정하였다.

#### 중심합성계획법을 통한 주요인자 최적화

주요인자인 당밀과 CSL에 대한 최적화를 위해 중심합성계획법을 이용하여 총 13개 실험조건을 설계하였으며 배양상등액의 효소활성을 측정하였다(Table 3). Minitab 프로그램을 이용한 회귀분석을 통해서 다음과 같은 이차다항식(second-order polynomial equation)을 얻었다.

$$Y = -4.99 - 0.094X_1 + 0.910X_2 + 0.0288X_1^2 - 0.00422X_2^2 - 0.02150X_1X_2$$

$R^2=0.840$ ; Y, 예상효소생산성;  $X_1$ , 당밀 농도;  $X_2$ , CSL 농도



Components (g/L)	LB	M1	M2	M3	M4
Yeast extract	10	10	10	10	10
NaCl	5	5	5	5	5
Tryptone	10	0	0	0	0
CSL	-	30	30	30	30
Molasses	-	10	10	10	10
$K_2HPO_4$	-	15	15	15	30
$KH_2PO_4$	-	5	5	5	10
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	2	2	2
$MgSO_4$	-	-	-	1	1

**Fig. 5. Time course analysis of BAGGT production in *B. subtilis* harboring pUBRTAG-BAGGT in modified media.** The composition of each medium is shown in the table below the figure.

**Table 1. Plackett-Burman design matrix for five variables with actual values along with BAGGT activity**

Runs	Experimental values (g/L)					BAGGT activity <sup>a</sup> ( $10^3$ U/mL)
	Molasses ( $X_1$ )	CSL ( $X_2$ )	Yeast extract ( $X_3$ )	NaCl ( $X_4$ )	Phosphate ( $X_5$ )	
1	12	24	6	4	8	11.28±0.53
2	12	36	6	4	12	9.95±0.25
3	8	24	6	6	12	6.81±0.83
4	12	24	6	6	8	7.52±0.39
5	12	36	4	6	8	9.98±0.46
6	8	24	4	6	12	6.46±0.53
7	8	36	6	4	12	8.49±0.34
8	12	24	4	4	12	8.00±0.31
9	8	36	6	6	8	9.64±0.53
10	12	36	4	6	12	9.36±0.70
11	8	36	4	4	8	8.68±0.24
12	8	24	4	4	8	7.43±0.50

<sup>a</sup>The values of BAGGT activity were the average±standard deviation from triplicate experiments.

상기 모델 식으로부터 최대 효소 생산을 위한 당밀 농도와 CSL의 농도는 각각 15 g/L과 60 g/L로 결정되었으며, 최대 생산성은 배지 1 mL 당  $20.1 \times 10^4$  U으로 예상되었다. 결정된 당밀과 CSL 조성의 최적배지[15 g/L 당밀, 60 g/L CSL, 6 g/L yeast extract, 4 g/L NaCl 및 8 g/L 인산염(6 g/L  $K_2HPO_4$ +2 g/L  $KH_2PO_4$ )]에서의 BAGGT 효소 생산성은 배지 1 mL 당  $(18.3 \pm 1.2) \times 10^3$  U으로 CCD를 통해 예측된 최대 활성의 91%이었으며, 이는 최적화 이전 LB 배지 대비 4.3배 수준이었다.



**Table 2. Evaluation of effects of five variables on BAGGT activity in Plackett-Burman design**

Variables (code)	Effect	Coefficient	t-value	p-value <sup>a</sup>
Molasses (X <sub>1</sub> )	1431.5	715.8	2.5	0.0047
CSL (X <sub>2</sub> )	1443.8	717.4	2.5	0.0046
Yeast extract (X <sub>3</sub> )	629.2	314.6	1.1	0.314
NaCl (X <sub>4</sub> )	-675.8	-337.6	-1.18	0.283
Phosphate (X <sub>5</sub> )	-911.8	-455.9	-1.59	0.163

<sup>a</sup>Non-significant at p>0.05

**Table 3. Central composite design of medium compositions and production of BAGGT**

Run	Level		Concentration (g/L)		BAGGT activity <sup>a</sup> (10 <sup>3</sup> U/mL)
	Molasses (X <sub>1</sub> )	CSL (X <sub>2</sub> )	Molasses (X <sub>1</sub> )	CSL (X <sub>2</sub> )	
1	-1	-1	16	40	16.86±0.92
2	1	-1	24	40	18.64±0.93
3	-1	1	16	60	19.97±0.44
4	1	1	24	60	18.31±0.54
5	-1.4142	0	14.4	50	18.92±0.94
6	1.4142	0	25.6	50	18.46±0.55
7	0	-1.4142	20	36	16.31±1.60
8	0	1.4142	20	64	17.61±0.66
9	0	0	20	50	17.98±1.21
10	0	0	20	50	18.58±0.99
11	0	0	20	50	18.31±1.51
12	0	0	20	50	15.19±0.75
13	0	0	20	50	17.46±0.73

<sup>a</sup>The values of BAGGT activity were the average±standard deviation from triplicate experiments.

## 요 약

본 연구를 통해 BAGGT를 재조합 *B. subtilis*를 이용하여 대량 생산하기 위하여 유전자 클로닝, 발현 시스템 구축 및 배지 최적화를 진행하였다. 이중프로모터 시스템을 이용하여 야생형 균주에 비해 42배 효소 생산성이 향상된 발현 시스템을 구축하였다. 또한 PBD 분석을 통해 당밀과 CSL이 재조합 *B. subtilis* 시스템에서 BAGGT의 생산성에 큰 영향을 주는 인자임을 확인하였으며, 염류의 첨가에 의한 효소 생산성 증대 효과는 미비하거나 부정적이었다. 탄소원으로 당밀을 선택하고 고가의 질소원인 트립톤을 저가의 CSL로 교체한 후 CCD 분석을 통해서 결정된 최적 배지 사용 시 최적화 이전의 LB 배지 대비 4.3배의 생산성 증대를 이루었으며, 이는 LB 배지에서 야생형 균주의 BAGGT 생산성 대비 180배의 효소 생산성 개선에 해당하였다. 본 연구를 통해 식품용 효소로서 BAGGT의 대량생산을 위한 공정을 구축하였으며, 이후 정미성 소재 생산에 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

## 감사의 글

본 논문은 (주)농심 중앙연구소와 농촌진흥청 공동연구사업 (PJ0112412017)의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

## References

- Inoue M. Glutathionists in the battlefield of gamma-glutamyl cycle. Arch. Biochem. Biophys. 595: 61-63 (2016)
- Suzuki H, Kumagai H. Autocatalytic processing of γ-glutamyl-transpeptidase. J. Biol. Chem. 277: 43536-43543 (2002)
- Castellano I, Merlino A, Rossi M, La Cara F. Biochemical and structural properties of γ-glutamyl transpeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans*: An enzyme specialized in hydrolase activity. Biochimie 92: 464-474 (2010)
- Okada T, Suzuki H, Wada K, Kumagai H, Fukuyama K. Crystal structure of the γ-glutamyltranspeptidase precursor protein from *Escherichia coli*. Structural changes upon autocatalytic processing and implications for the maturation mechanism. J. Biol. Chem. 282: 2433-2439 (2007)
- Minami H, Suzuki H, Kumagai H. Salt-tolerant γ-glutamyl-transpeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity. Enzyme Microb. Technol. 32: 431-438 (2003)
- Hillmann H, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF, Hofmann T. Formation of kokumi-enhancing γ-glutamyl dipeptides in parmesan cheese by means of γ-glutamyltransferase activity and stable isotope double-labeling studies. J. Agr. Food Chem. 64: 1784-1793 (2016)
- Zhao CJ, Gnzle MG. Synthesis of taste-active γ-glutamyl dipeptides during sourdough fermentation by *Lactobacillus reuteri*. J. Agr. Food Chem. 64: 7561-7568 (2016)
- Wang Q, Min C, Zhu F, Xin Y, Zhang S, Luo L, Yin Z. Production of bioactive γ-glutamyl transpeptidase in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner and application of the recombinant enzyme to L-theanine synthesis. Curr. Microbiol. 62: 1535-1541 (2011)
- Mu W, Zhang T, Jiang B. An overview of biological production of L-theanine. Biotechnol. Adv. 33: 335-342 (2015)
- Shuai Y, Zhang T, Mu W, Jiang B. Purification and characterization of γ-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* SK11. 004. J. Agr. Food Chem. 59: 6233-6238 (2011)
- Vermeulen N, Gnzle MG, Vogel RF. Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. 103: 1197-1205 (2007)
- Pariza MW, Johnson EA. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. Regul. Toxicol. Pharmacol. 33: 173-186 (2001)
- Schumann W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. Adv. Appl. Microbiol. 62: 137-190 (2007)
- Nguyen HD, Nguyen QA, Ferreira RC, Ferreira L, Tran LT, Schumann W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. Plasmid 54: 241-248 (2005)
- Chen PT, Chiang CJ, Chao YP. Strategy to approach stable production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Prog. 23: 808-813 (2007)
- Kang HK, Jang JH, Shim JH, Park JT, Kim YW, Park KH. Efficient constitutive expression of thermostable 4-α-glucanotransferase in *Bacillus subtilis* using dual promoters. World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 1915-1918 (2010)
- Choi CH, Kim SH, Jang JH, Park JT, Shim JH, Kim YW, Park KH. Enzymatic synthesis of glycosylated puerarin using maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* expressed in *Bacillus subtilis*. J. Sci. Food Agric. 90: 1179-1184 (2010)
- Zhang K, Su L, Duan X, Liu L, Wu J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. Microb. Cell Fact. 16: 32 (2017)
- Keskin Gündoğdu T, Deniz İ, Çalıřkan G, Şahin ES, Azbar N. Experimental design methods for bioengineering applications. Crit. Rev. Biotechnol. 36: 368-388 (2016)
- Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33: 305-325 (1946)
- Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CK. Strategies for fermentation medium optimization: An in-

- depth review. *Front Microbiol.* 7: 2087 (2017)
22. Ahn JH. Characterization of  $\gamma$ -glutamyltransferase in *Bacillus amyloliquefaciens*. MS thesis, Korea University, Seoul, Korea (2013)
  23. Kim MS, Jang JH, Kim YW. Overproduction of a thermostable 4- $\alpha$ -glucanotransferase by codon optimization at N-terminus region. *J. Sci. Food Agric.* 93: 2683-2690 (2013)
  24. Sadaie Y, Kada T. Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* 153: 813-821 (1983)
  25. Yamazaki H, Ohmura K, Nakayama A, Takeichi Y, Otozai K, Yamasaki M, Tamura G, Yamane K.  $\alpha$ -Amylase genes (*amyR2* and *amyE'*) from an  $\alpha$ -amylase-hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: molecular cloning and nucleotide sequences. *H. Bacteriol.* 156: 327-337 (1983)
  26. Li L, Ma Y. Effects of metal ions on growth,  $\beta$ -oxidation system, and thioesterase activity of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* 97: 1-8 (2014)