

SUC2 Gene 을 갖는 재조합 *Saccharomyces cerevisiae* 의 Invertase 발현특성

정상철¹ · 장재권² · 김인규 · 변유량*

*연세대학교 식품공학과 ¹제일제당연구소 ²해태식품연구소

Expression of Invertase in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Containing *SUC2* Gene

Jung, Sang-Cheol¹, Jae-Kweon Jang², In-Gyu Kim and Yu-Ryang Pyun*

*Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

¹Food Research Institute, Cheil Sugar Co., Kyongi-do, Korea

²HaiTai Food Research Institute, Seoul, Korea

To maximize the performance of recombinant cell fermentation process through optimizing environmental conditions, the production of invertase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing *SUC2* gene was studied as a model. The recombinant cells showed biphasic growth on glucose. Since the promoter of the *SUC2* is regulated by the concentration of glucose in the medium, expression of invertase by recombinant yeast began when the glucose concentration decreased in a range of 0.25-0.4 g/L during the batch culture. Plasmid segregation occurred frequently during glucose fermentation, and infrequently during ethanol oxidation. A rapid appearance of invertase activity with glucose was observed under nonaerated condition, and the maximum specific invertase activity was about 1.5 times as high as under aerobic condition. In fed batch culture, when a low level of glucose was continuously supplied to the fermentor after the time of glucose depletion during growth phase, specific and total invertase activity increased about 1.7 and 2.9 fold, respectively, in a batch culture.

최근 유전자 재조합 미생물을 이용하여 유용한 단백질은 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(1-3). 재조합 미생물은 플라스미드의 삽입에 의하여 일반적으로 클론된 유전자의 발현이 잘 될수록 숙주세포의 증식속도가 감소하며 또한 어떤 경우에는 생산된 유전제품에 의하여 재조합 균주의 생육이 저해되기도 한다. 따라서 재조합 균주의 생산성을 향상시키기 위해서는 발효과정에서 클론된 유전자의 발현을 조절할 필요가 있으며, 이와 같은 문제는 배양환경조건을 변화시킴으로써 클론된 유전자의 발현을 제어할 수 있는 regulated promoter 를 이용함으로써 해결할 수 있다(4-6). *E. coli* 에 대한 regulat-

ed promoter 로써는 *trp*, λ P_L 및 *lac* promoter 등이 사용되고 있다.

공업적으로 유용한 균주로서 널리 이용되어온 *S. cerevisiae* 는 외부유전자의 발현을 위한 숙주세포로서 더욱 관심이 높아지고 있다. 효모의 *SUC2* gene 은 secreted, glycosylated invertase 와 intracellular, nonglycosylated invertase 를 생산하며, 이들의 대부분은 glycosylated invertase 로써 periplasmic space 에 약 90% 가 위치한다. *SUC2* gene 의 promoter 는 배지중 글루코오스 농도에 의하여 조절을 받아 효소활성이 100~1000 배 변하는 것으로 보고(7, 8)되고 있으며, *SUC2* gene 의 signal

Key words: Invertase, *SUC2* promoter, controlled gene expression

*Corresponding author

sequence를 이용한 효모 내에서 외부 유전자의 발현과 분비에 대한 연구가 활발히 연구되고 있다.

본 연구는 유전자 재조합 균주의 생산성을 향상시키기 위한 발효시스템의 개발에 관한 연구의 일부분으로서 uracil 영양요구성 균주인 *S. cerevisiae*를 숙주균으로 하고 vector로써는 *SUC2* gene을 함유하고 있는 pRB 58을 사용하였으며, 이 재조합 균주의 생육특성, invertase 발현에 미치는 글루코오스의 영향, fed batch 발효에 의한 글루코오스 농도의 제어로 균체생육과 유전자 발현의 2단계 배양에 의한 생산성 향상을 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid vector

Saccharomyces cerevisiae SEY 2102(MAT α , ura3-52, leu2-3, -112, his4-519, sup-am)를 숙주로 사용하고 amber mutation(8)된 invertase의 구조유전자 *SUC2*를 yeast shuttle vector YEp 24에 재조합시킨 pRB 58을 vector로 사용했으며 Fig.1에 gene map을 나타내었다.

배 지

선별배지(selective medium)는 1l 당 YNB(w/o amino acids) 6.56g, NaOH 6g, succinic acid 10g, (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ 1g, histidine 0.02g, leucine 0.03g의 조성을 가지며 탄소원으로는 글루코오스를 사용하였다. 비선별배지(nonselective medium)로는 선별배지에 30 mg/ml의 uracil을 첨가하여 사용하였다.

배양조건

균주 접종액은 반드시 각 플라스미드를 포함하고 있어야 하므로 한천배지상에서 single colony를 선별하여 2% 글루코오스를 함유한 uracil이 없는 100 ml 선별배지가 든 500 ml 삼각 플라스크에 접종한 뒤 30°C에서 전배양하였다. Invertase activity가 나타나지 않는 대수증식기 중간인 21 시간 배양한 전배양액 60 ml를 원심분리하여 균체를 회수하고 살균 증류수로 3번 세척하여 약 10.4 mg/6 ml 정도되는 균체를 모든 실험의 접종량으로 사용하였다(9).

삼각 플라스크를 이용한 회분발효에서는 1l 삼각 플라스크에서 working volume을 200 ml로 하였으며 교반속도는 100 rpm, 배양온도는 30°C, pH는 5.4로 조절하였다. 발효조를 이용한 회분발효에서는 2l jar fermentor(Marubishi Co., Model MD-250)에서 working volume을 1l로 하였으며 300 rpm, 0.6 vvm

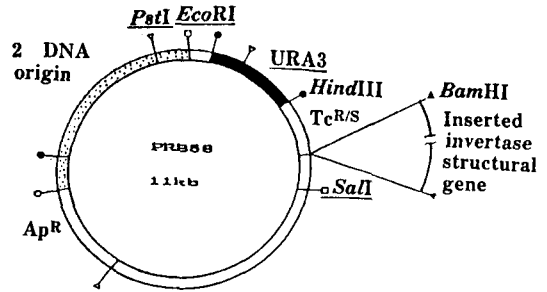


Fig. 1. Gene map of recombinant plasmid pRB58.

의 호기적 조건과 250 rpm, 0 vvm의 비통기적 조건에서 배양하였다.

Fed batch 발효는 비통기적 조건으로 초기 working volume 800 ml에서 시작하여 글루코오스 농도가 고갈되는 지점에서 글루코오스를 함유한 배지를 각각 124 ml/h(0.248g glucose/124 ml), 48 ml/h(0.096g glucose/48 ml)의 유량으로 6h 및 12h 공급하였다.

분석방법

균체량은 비탁법에 의하여 spectrophotometer (Model Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 640 nm에서 일정시간 간격으로 채취한 배양액의 흡광도로 측정하였다. 환원당은 glucose-oxidase (Sigma Co.)를 사용하여 분석하였으며 에탄올은 FID 검출기를 사용하여 gas chromatography (Varian 1440)로 측정하였으며 내부 표준물질로 0.5%의 butanol을 첨가하여 분석하였다.

플라스미드의 안정성은 한천을 포함한 비선별배지와 선별배지에 각각 tooth picking하여 형성된 colony의 수로 측정하였다.

효소의 역가측정

Invertase의 역가는 Keilin(10) 등의 방법에 따라 측정하였다. 배양액 1.5 ml를 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 증류수로 세척하였다. 세척균체를 적당히 회석시킨 후 pH 4.7의 acetate buffer 0.5 ml를 혼합하여 30°C 물중탕에서 sucrose 용액 1 ml를 넣고 3분간 반응시킨 다음 DNS 시약 1.5 ml를 첨가하여 끓는 물에서 5분간 끓인 후 흐르는 물에 냉각시킨 다음 증류수 10 ml를 혼합한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하여 이미 구한 표준곡선에 의하여 invertase activity를 구하였다.

효소 1 KU는 표준정량 곡선에서 3분 동안 1

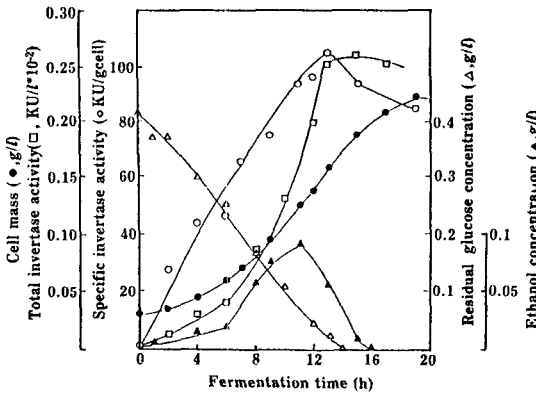


Fig. 2. Typical fermentation profile of recombinant *S. cerevisiae* in 0.04% glucose selective medium.

μ mole의 글루코오스를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

생육특성과 글루코오스 농도의 영향

재조합 효모를 선별배지에서 플라스크 회분배양했을 때 대표적인 생육특성을 Fig.2에 나타내었다. 효모는 diauxic growth를 나타내어 글루코오스 농도가 높은 배양 전반기에는 발효에 의하여 에탄올이 축적되었으며 글루코오스가 거의 고갈되어 잔존농도가 0.52mg/l인 배양 11 시간에 최대농도를 나타내었고 그 이후에는 축적된 에탄올을 효모가 자화하여 생육하였다. 한편 total invertase activity는 글루코오스가 소비되는 발효 전반기에 급격히 증가하여 글루코오스가 고갈된 시점인 13 시간에 최고값 25.2KU/l에 도달하였고 이 때 균체농도는 0.16g/l였다. 배양 13 시간 이후 total invertase activity는 일정하게 유지되었으나 축적된 에탄올을 자화하여 효모는 계속 생육하여 최종 균체량은 배양 20 시간일 때 0.22g/l로 증가하였다. 따라서 specific invertase activity도 글루코오스가 완전히 고갈될 13 시간에 최대치 93.4 KU/g을 나타내고 그 이후에는 total invertase activity는 거의 변화없으나 균체량의 계속적 증가로 specific invertase activity는 감소하는 현상을 나타내었다.

*S. cerevisiae*는 글루코오스 농도가 임계농도 이상이면 호기적 상태에서도 알콜발효를 한다는 사실은 잘 알려져 있으며, 글루코오스가 아주 낮은 농도일 때는 글루코오스와 에탄올을 동시에 자화하는 것으로 보고되고 있다. Toda(11-14) 등은 글루코오스 농도에 민감한 *S. calbergensis*에 의한 invertase 생

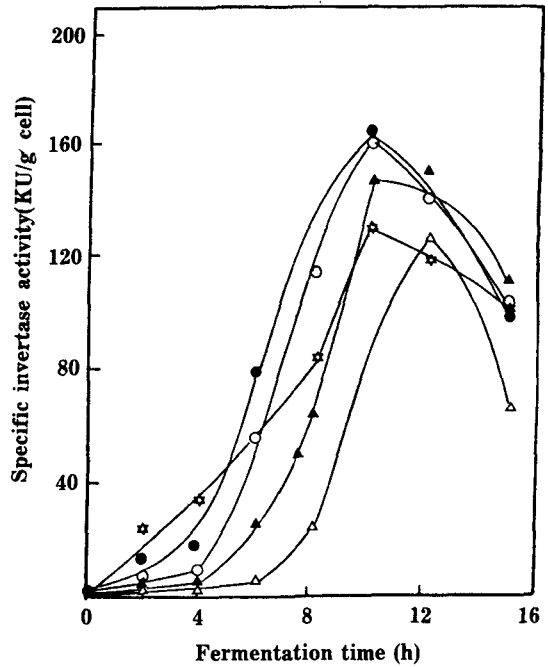


Fig. 3. Effect of glucose concentration on expression level of cloned gene product (invertase) in selective medium.

Initial glucose condition (%) : 0.06(☆), 0.09(●), 0.13(○), 0.18(▲), 0.22(△)

산에 있어서 글루코오스의 영향에 대한 상세한 연구를 하였으며 글루코오스가 고갈되는 시점에서 specific invertase activity가 최대치에 도달한다고 보고하였다. 본 연구의 재조합 균주에 의한 specific invertase activity는 Toda(11-14) 등이 보고한 효모에 비하여 약 16배 증가된 값이다.

재조합 효모의 invertase activity의 발현에 미치는 글루코오스 농도의 영향을 Fig.3에 나타내었다. 초기 글루코오스 농도가 0.6g/l일 때는 효소활성이 나타나는 지연시간이 아주 짧았으나 초기 글루코오스 농도가 높아질수록 지연시간이 길어져 글루코오스 농도 0.9g/l일 때는 효모의 대수증식기 초기에, 2.2g/l일 때는 대수증식기의 중기부터 효소활성이 나타나기 시작하였다. 초기 글루코오스 농도와 효모의 growth phase에 관계없이 배지 중의 글루코오스 농도가 0.25~0.4g/l로 감소되는 시점에서 효소활성이 나타나는 현상은 글루코오스 농도가 높은 배양 초기에는 *SUC2* promoter가 glucose repression을 받아 invertase가 발현되지 못하며, 글루코오스 농도가 임계농도 이하가 되면 repression이 해제되어 invertase가 발현되기 시작하는 것으로 생각된다.

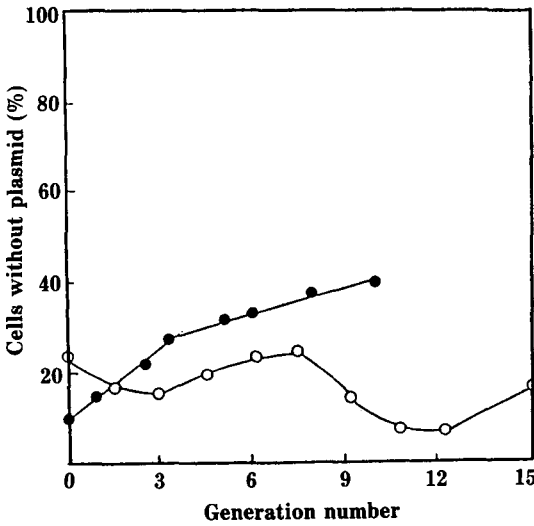


Fig. 4. Plasmid stability in batch culture. ●; nonselective ○; selective medium

Dodyk(9)은 빵효모 *S. cerevisiae*의 invertase 생산에 대한 연구에서 이와 유사한 결과를 얻었으며 글루코오스 농도 0.03 M까지는 invertase의 생성이 억제되었다가 0.03 M 이하부터 invertase activity가 생성되기 시작하여 글루코오스가 고갈될 때까지 계속되었다고 하였다. 또한 글루코오스 농도는 invertase 생성속도와 최대량에도 깊은 영향을 미쳐 초기농도 0.01 M까지는 생성속도와 최대 invertase activity가 증가하고 그 이상의 글루코오스 농도에서는 감소하여 최적 초기농도는 0.01 M 이라고 보고하였다. 본 재조합 균주인 경우에는 초기 글루코오스 농도 0.9, 1.3 및 1.8g/l일 때 specific invertase activity는 Fig.3에 나타낸 것과 같이 각각 167.5, 166.3 및 149.8 KU/g였으나 total invertase activity는 49.6, 57.6 및 52.0 KU/l를 나타내었다. 따라서 비활성과 총활성이 동시에 가장 높은 초기농도 1.3g/l가 플라스크 회분배양시 최적 글루코오스 농도인 것으로 판단된다.

한편 플라스크 회분배양에서의 생육특성 값을 살펴보면 전반기 글루코오스 소비시기의 비증식속도 (μ_s)는 0.224 h⁻¹에서 0.266 h⁻¹범위로 초기 글루코오스 농도가 증가하면 증가하는 경향을 보였으며 균체 수율은 ($Y_{x/s}^{res}$)은 0.24g/g에서 0.14g/g으로 초기 글루코오스 농도의 증가에 따라 respiration에 의한 균체 생성량은 현저히 감소하였다. 글루코오스 발효에 의한 에탄올 수율 ($Y_{x/s}^{ferm}$)은 0.41~0.51g/g 범위였으며 배양후기의 에탄올 자화수율은 0.4~0.49g/g였다. Coppella(15) 등은 α -factor를 이용한 hEGF의

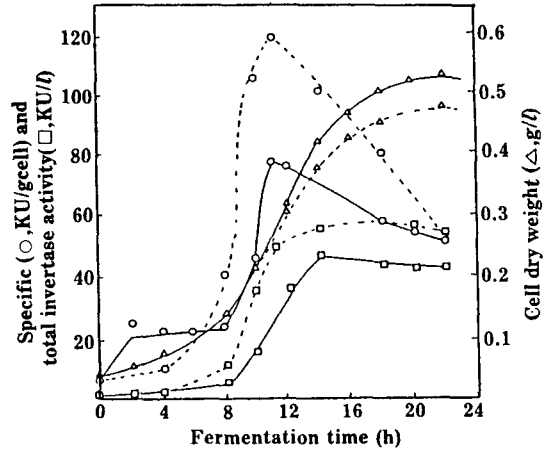


Fig. 5. Comparison of enzyme activity and cell mass under aerated (—) and nonaerated condition (---) in 0.1% glucose selective medium.

S. cerevisiae 내에서의 발현에 대한 연구에서 diauxic growth와 각종 수율에 있어 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다.

회분배양에서 플라스미드의 안정성

플라스미드의 안정성은 재조합미생물의 발효공정에서 중요한 관건이므로 플라스크 회분배양 중 플라스미드의 안정성을 검토하였다. Uracil을 첨가한 비선별배지에서 플라스미드의 안정성을 Fig.4에 나타내었다. 생육속도가 빠른 글루코오스 발효기간 동안에는 플라스미드의 분리가 빨리 일어나 3세대 후에는 플라스미드를 함유한 세포가 70% 정도였으나 그 이후의 에탄올 자화기간 동안에는 플라스미드의 분리가 완만하여 10세대 후에 플라스미드를 함유한 세포가 60% 정도로 7세대 동안에 단지 10%만이 플라스미드가 분리되었다.

한편 uracil이 첨가되지 않은 선별배지에서의 플라스미드 안정성은 Fig.4에 나타낸 것처럼 약간 진동하는 현상을 보였으며 40세대 동안의 선별배지에서 생육하는 세포의 평균비율은 83.4%였다. 이 현상은 세포가 분열할 때 플라스미드를 함유하지 않은 딸세포가 생겨나도 이 딸세포는 분열전 모세포에서 만들어진 complimenting product인 uracil을 가지고 있을 수 있으며 이 경우 일정기간 동안 선별배지에서 생육할 수 있기 때문인 것으로 생각된다.

통기의 영향

발효조에서 용존산소를 75% 포화시킨 호기적 조건에서 회분배양한 결과를 Fig.5에 나타내었다. 발

효 11 시간 후에 글루코오스가 완전히 고갈되고 이때 specific invertase activity는 최고값 77.5 KU/g을 나타내었는데 플라스크 배양의 결과인 Fig.3의 167.5 KU/g과 비교하면 약 1/2의 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 통기와 교환이 invertase 발현에 영향을 미칠 것으로 생각되어 동일조건에서 공기를 공급하지 않고 배지중의 용존 산소와 발효조 상부의 공기에 의해서만 생육하도록 한 결과 전반적으로 발효양상은 통기한 경우와 비슷하였다. 그러나 통기하지 않은 경우 균체 수율이 다소 낮고 에탄올 생성량이 약간 많았으며 invertase의 총활성과 비활성은 각각 49.6 KU/l와 119.5 KU/g으로 통기한 경우의 28.4 KU/l와 77.5KU/g보다 현저히 향상되었다. Vitolo(16) 등은 압착효로부터 분리한 *S. cerevisiae*를 당밀 배지로 연속배양한 결과 통기량과 교환속도를 증가시킴에 따라 invertase activity가 증가하였다고 보고하였다. 또한 Dodyk(9) 등은 혐기성 조건에서 글루코오스에 배양했을 때 invertase가 급속히 생성되었으나 효소의 최대활성은 동일 글루코오스 농도의 호기적 조건에서 배양했을 때의 60%에 지나지 않는다고 하였다. 이와 같은 야생 효모에서와 달리 효모의 host-vector system에서 호기적 발효가 비통기적 발효에서 보다 invertase 생산이 낮은 점은 호기적 조건에서는 에너지 대사가 숙주의 생육쪽으로 치우쳐 invertase 생산이 적으나 비토기적 조건에서는 생육이 억제 되므로 에너지 대사가 숙주의 생육과 vector 발현의 양쪽으로 적절히 분배되기 때문에 invertase 생산이 증대되는 것이 아닌가 추측된다. 통기량 조절이 유전자 발현에 큰 영향을 미치는 중요한 인자로 생각되어 앞으로 상세히 연구할 예정이다.

Fed batch 배양

SUC2 gene의 promoter는 글루코오스 regulation을 받기 때문에 배지중의 글루코오스 농도를 조절함으로써 균체의 증식단계와 invertase의 발현단계로 구분하여 발효하는 것이 가능할 것으로 생각된다. 즉 증식단계에서 배지중 글루코오스 농도를 비교적 높게 유지하여 유전자의 발현을 억제하면서 효율적으로 균체를 증식시키고 발현단계에서 invertase 합성에 필요한 균체의 활성만 유지할 수 있도록 저농도의 글루코오스를 공급하여 invertase 생산을 증대시킴으로써 유전제품의 발효생산성을 현저히 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 선별배지에서 초기 1g/l의 글루코오스 농도에서 비통기적 조건으로 회분배양하여 글루코오스 repression이 해제되는

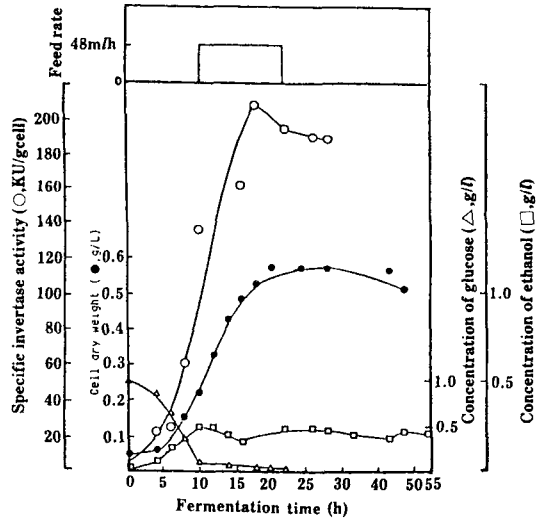


Fig. 6. Fed batch culture of recombinant *S. cerevisiae* by feeding 0.96g glucose per hour.

지점에서 YNB, histidine, leucine, $(NH_4)_2SO_4$ 의 영양분을 함유한 글루코오스 용액을 48 ml/h(0.096g 글루코오스/48 ml)의 유량으로 12 시간 동안 연속적으로 공급시켜준 결과를 Fig.6에 나타내었다.

초기배지중의 글루코오스가 고갈되는 시점에서 저농도의 글루코오스를 첨가해준 결과 invertase 생산은 배양 19시간까지 계속 증가되어 invertase의 총활성과 비활성이 각각 앞의 비통기적 회분배양 결과보다 1.74 배, 2.74 배 증가된 결과를 얻었다. 한편 글루코오스 용액을 공급하기 시작한 후 11 시간 지점에서는 균체농도의 증가로 글루코오스 소비속도가 글루코오스 공급속도보다 커 invertase가 유도되는데 글루코오스 양이 부족하여 specific invertase activity가 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 균체량의 증가에 비례하여 제한된 글루코오스의 공급유량을 적절히 증가시켜 주면 invertase의 생산이 계속 증가될 것이며 더욱 고농도 배양이 가능할 것으로 생각된다.

또한 결과는 나타내지 않았으나 여러번의 실험에서 본 재조합 균주의 invertase의 지속적인 발현을 위해서 글루코오스 용액의 첨가시기가 중요하였으며 초기 글루코오스가 고갈된 후 에탄올을 소화하는 시기로 넘어간 후에는 글루코오스를 첨가하여도 invertase는 곧 발현되지 않았다. 또한 글루코오스만을 공급했을 때 invertase 생산이 증대되지 않았으며 YNB, histidine, leucine, $(NH_4)_2SO_4$ 등과 같은 영양성분을 같이 첨가하여야만 invertase 생산이 증대됨을 알 수 있었다.

Table 1. Comparison of maximum invertase activity during fermentor culture.

	Maximum specific invertase activity (KU/g cell)	Maximum total invertase activity (KU/L)
Aerated batch	77.51	45.88
Nonaerated batch	119.45	58.34
Fed-batch (0.24g glucose/124 mL h)	177.51	119.69
Fed-batch (0.096g glucose/48 mL h)	207.94	162.82

한편 Fig.6 과 동일한 조건에서 공급되는 글루코오스 농도를 높여서 124 ml/h (0.248g glucose/124 ml)의 유량으로 6시간 동안 연속적으로 공급하였을 때는 약간의 글루코오스 repression을 받아 Fig.6의 결과보다 다소 invertase 생산량이 감소된 결과를 얻었다.

이상의 각 배양법에 따른 invertase activity를 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. Fed batch의 결과를 종합해 볼 때 배지 중 글루코오스 농도의 조절로 균체생육과 유전자 발현의 제어가 가능하며 optimum feeding profile 등 fed batch에 대한 보다 상세한 연구로서 invertase의 생산성은 더욱 향상될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

유전자의 재조합 균주의 생산성을 향상시키기 위한 발효시스템 개발을 목적으로 regulated promoter인 *SUC2* gene을 갖는 유전자 재조합 *S. cerevisiae*를 모델로하여 유전자 산물인 invertase 발현에 미치는 글루코오스 농도의 영향, 발효 중 플라스미드의 불안정성, 생육특성 및 continuous fed batch system을 연구하였다.

유전자 재조합 균주는 biphasic growth 현상을 보였으며 글루코오스 농도가 0.9g/l에서 2.2g/l로 증가함에 따라 비증식 속도는 0.224 h⁻¹에서 0.226 h⁻¹로 증가했으며 숙주효모보다 낮은 값을 나타내었다. 유전자 재조합 균주의 invertase 생산은 발효조내의 글루코오스 농도에 크게 영향을 받아 글루코오스 농도가 0.25~0.4g/l로 감소될 때 invertase 생산이 시작되었으며 회분발효중 플라스미드의 분리는 글루코오스 자화기간 동안에 빈번히 일어났으나 에탄올을 자화

기간에는 완만해지는 경향을 보였다.

또한 통기를 해주지 않고 배지의 용존산소만으로 배양시킨 결과 통기를 한 경우에 비하여 invertase의 비활성과 총활성이 각각 1.5 및 1.3 배 증가되었다.

균체의 증식단계와 유전자의 발현단계로 구분하여 발효시키기 위하여 영양분을 함유한 글루코오스 용액을 48 ml/h (0.096g 글루코오스/48 ml)의 유량으로 12시간 연속적으로 공급하여 fed batch 배양한 결과 invertase의 비활성과 총활성이 비통기적 회분배양보다 각각 1.74, 2.74 배 증가되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 1988년도 목적기초연구비에 의하여 이루어졌으며 이에 깊이 감사드린다.

참고문헌

1. Seo, J.H. and E.B. James: *Biotech. Bioeng.*, **27**, 1668 (1985).
2. Srienice, F., J.C. Cambell and E.B. James: *Biotech. Bioeng.*, **18**, 996 (1986).
3. Klotz, L.C.: *Annals of New York Academy of Science*, **413**, 1 (1983).
4. Aiba, S. and J. Koizumi: *Biotech. Bioeng.*, **26**, 1026 (1984).
5. Parker, C. and D. Dibiasia: *Biotech. Bioeng.*, **29**, 215 (1987).
6. Siegel, R. and D.D. Ryu: *Biotech. Bioeng.*, **27**, 28 (1987).
7. Frederick, K.C. and F. Maley: *J. Biology Chem.*, **13**, 6392 (1980).
8. Carson, M. and D. Bostein: *Cell.*, **28**, 145 (1982).
9. Dodyk, M. and A. Rothstein: *Archi. Biochem. Biophys.*, **104**, 478 (1964).
10. Keilin, D. and E.F. Hartree: *Biochem.*, **50**, 531 (1952).
11. Toda, K. and I. Yabe: *Biotech. Bioeng.*, **21**, 487 (1979).
12. Toda, K.: *Biotech. Bioeng.*, **18**, 1103 (1976).
13. Toda, K.: *Biotech. Bioeng.*, **18**, 1117 (1976).
14. Toda, K., I. Yabe and T. Yamagata: *Biotech. Bioeng.*, **22**, 1805 (1980).
15. Coppella, S.J. and P. Dhurjati: *Biotech. Bioeng.*, **27**, 976 (1989).
16. Vitolo M., M.L.R., Vairo and W. Borzani: *Biotech. Bioeng.*, **25**, 9 (1987).

(Received June 8, 1989)