GOVP1200507774

BSHSM0070134-2002030-1

섬유가공용 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균주의 분자육종과 공업적 응용

Molecular improvement of *Bacillus* strains producing textile-treating enzymes, and the industrial applications

한국생명공학연구원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 "섬유가공용 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균주의 분자육종과 공업적 응용" 과제의 보고서로 제출합니다.

2002년 10월

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 박승환(한국생명공학연구원 책임연구원)

연 구 원 : 최수근(〃 선임연구원)

김지현(〃 선임연구원)

김성빈(〃 연수연구원)

이현희(〃 위촉연구원)

이수현(〃 위촉연구원)

공동연구기관명 : (주)제노포커스 부설연구소

공동연구책임자 : 정홍채((주)제노포커스 부설연구소 소장)

연 구 원 : 반재구((주)제노포커스 대표이사)

김의중((주)제노포커스 부설연구소 선임연구원)

이한승(〃 선임연구원)

김선택(〃 선임연구원)

홍국기(〃 연구원)

박태정(〃 연구원)

양재승(〃 연구원)

장준성(〃 연구원)

위탁과제 1 : 윤기홍 (우송대학교 식품생명공학과 교수)

여 백

편집순서 3

보고서 초록

<table>
<tr><td>과제관리번호</td><td></td><td>해당단계
연구기간</td><td>1998.9.1-2002.8.31</td><td>단계 구분</td><td colspan="2">3 / 3</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구사업명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="5">선도기술개발사업</td></tr>
<tr><td>세부사업명</td><td colspan="5">신기능생물소재 기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구과제명</td><td>중 과 제 명</td><td colspan="5"></td></tr>
<tr><td>세부(단위)과제명</td><td colspan="5">섬유가공용 효소 생산을 위한 Bacillus 균주의 분자육종과 공업적 응용</td></tr>
<tr><td>연구책임자</td><td>박 승 환</td><td>해당단계
참여연구원수</td><td>총 : 66 명
내부 : 32 명
외부 : 34 명</td><td>해당단계
연구비</td><td colspan="2">정부: 671,424 천원
기업: 165,000 천원
계: 836,424 천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소속부서명</td><td colspan="2">한국생명공학연구원
미생물유전체연구실</td><td>참여기업명</td><td colspan="3">(주)제노포커스
(주)상우화학</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="6">상대국명 : 상대국연구기관명 :</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="6">연구기관명 : 우송대학교 연구책임자 : 윤 기 홍</td></tr>
<tr><td colspan="5">요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)</td><td>보고서
면수</td><td>145</td></tr>
</table>

○ 효소유전자 고분비/발현 시스템 개발;
- mRNA 안정화 인자(STEP)와 stationary phase에서 발현되는 *B.t.* 균 유래의 SEP promoter를 이용한 발현시스템을 개발하였음
- α-amylase promoter 와 SEP promoter를 이용한 dual promoter 발현시스템을 개발하였음

○ 효소의 산업적 생산을 의한 숙주균 개발;
- 효소 생산성이 2배 이상 향상되고 배양시 pH조절이 용이한 *B. licheniformis* 변이주 PN6 개발
- *Bacillus* sp. 79-23 분리주를 이용한 숙주균을 개발함
- *B.t.* 균을 효소생산 숙주균으로 개발함

○ molecular evolution에 의한 cellulase와 α-amylase 유전자 개발;
- DNA shuffling 방법에 의한 diversity 창출 기술과 cell surface display 방법에 의한 high-throughput screening 기술을 구축하였음,
- molecular evolution을 통해 cellulase 및 α-amylase의 specific activity가 각각 5배와 4배 증가된 효소변이체를 개발함

○ α-amylase 고생산 *Bacillus* 균주 개발;
- mRNA 안정화 인자, SEP promoter를 이용한 α-amylase의 고발현시스템을 개발하였고, 이를 PN6변이주에 도입하여 고생산 균주 PN63을 개발하였음, 실험실 배양조건하에서 3200 units/ml 수준의 생산성에 도달

○ cellulase 고생산 *Bacillus* 균주 개발;
- 위에서 기술한 α-amylase의 고발현시스템을 cellulase에 적용시켜 cellulase고발현 시스템을 제작하였고 이를 *B. licheniformis*균에 도입하여 고생산균주 제작함

○ 대량 생산 공정기술 수립;
- PN6균주로 대량배양시험 결과 α-amylase는 15,000 units/ml 이상 도달, cellulase는 300units/ml 수준에 도달

<table>
<tr><td rowspan="2">색 인 어
(각 5개 이상)</td><td>한 글</td><td>효소, 알파아밀라아제, 셀룰라아제, 섬유가공, 바실러스 리케니포미스</td></tr>
<tr><td>영 어</td><td>enzyme, α-amylase, cellulase, bio-washing, Bacillus licheniformis</td></tr>
</table>

여 백

요 약 문

I. 제 목

섬유가공용 생산을 위한 *Bacillus* 균주의 분자육종과 공업적 응용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

환경오염문제의 심각성에 대한 이해와 환경보전의 중요성에 대한 인식이 깊어지면서 청정기술/청정공정에 대한 개발 필요성이 점차 증대되고 있다. 섬유가공분야에 있어서도 마찬가지로 환경친화적 공정을 위한 효소의 유용성이 지속적으로 증대되어 왔다. 면사 직조시 처리한 전분 제거를 위해 호발제로서 α-amylase가 사용되며, 청바지 염색에 사용한 Indigo를 균일하게 탈색시키는 washing 공정에 cellulase가 사용된다. 종래의 Indigo 탈색은 경석을 이용하여 물리적으로 하였으나 기계적 손상이 크고 많은 노동력과 에너지를 필요로 하는 단점이 있다. 그러나 cellulase를 이용한 Bio-washing 공정은 비용이 저렴할 뿐만 아니라 indigo의 균일한 탈색을 통해서 자연스러운 색상의 실현이 가능해진다 cellulase는 면직물의 질을 향상시키기 위한 polishing에도 사용되는데 cellulase처리 시 인쇄의 명확도, 색상의 선명도, 표면 촉감, 구김 저항도, 유연도 등의 품질 향상을 가져올 수가 있다. 특히 최종 면직제품에 cellulase를 처리하여 면직류의 윤택도와 촉감 등을 향상시킴으로써 면직물의 고품질화를 통해 섬유산업의 부가가치를 증대시킬 수도 있다.

이와 같은 섬유가공 목적에 부합하기 위해서는 내열성 α-amylase와 중성 cellulase를 저렴하게 대량생산 할 수 있는 기술이 필요하다. 일반적으로는 곰팡이를 이용하여 산업용 효소를 대량 생산하는데 *Aspergillus*와 *Trichoderma* 등의 곰팡이에서 생산되는 효소는 중온성 α-amylase 와 산성-중온성 cellulase로서 면직물 가공용으로는 적합치 못한 점이 있다. 즉 중온성 α-amylase는 호발율이 낮은 단점이 있고, 산성-중온성 cellulase는 back staining에 의해 얼룩이 생기는 점과 발효생산 시 여러 종류의 cellulase가 함께 생산되고 이 혼합 cellulase가 면직물에 작용하여 면직물 강도를 저하시키는 부작용이 있다. 그러므로 섬유가공용으로 세균 유래의 중성 cellulase가 더욱 선호되고 있으며 그 가격도 곰팡이 효소보다 2~3배 가량 높은 편이다.

이러한 배경 하에 본 연구에서는 *Bacillus*균을 숙주로 하여 내열성 α-amylase와 중성

cellulase를 산업적으로 생산할 수 있는 균주를 개발하고자 하였다. 외국에서 *Bacillus* 산업균주를 이용하여 효소를 상업적으로 생산하고 있지만 산업균주 개발 기술은 특허 또는 know-how로서 철저히 보호되고 있고 균주를 직접 입수하기 위해서는 막대한 로얄티를 물어야하는 실정이므로 국내고유의 기술을 개발하는 것이 필요하였다.

본 연구에서는 반응 특성이 우수한 섬유가공용 효소 유전자원을 확보하고 이들 효소를 산업적으로 생산할 수 있는 *Bacillus* 균주의 개발 과정을 통해 **①유용 효소 고발현을 위한 분비발현계 개발, ②산업용 효소의 생산을 위한 *Bacillus*숙주균 개발, ③ cellulase와 α-amylase 고생산성 *Bacillus*균주 개발, ④개발균주를 이용한 생산공정 최적화 및 산업화**를 달성하고자 하였다.

II. 연구개발의 내용 및 범위

- *Bacillus* 균주 개발을 위한 기반기술 확립
  - host-vector system
  - 형질전환 밥법
  - *B. licheniformis*균 염색체상에서의 유전자 증폭
- 효소 고생산을 위한 *Bacillus* 숙주균의 개발
  - *B. licheniformis*균을 숙주로 이용한 효소생산
  - *B. thuringensis*균을 숙주로 이용한 효소생산
  - *Bacillus* sp. 79-23 분리균을 숙주로 이용한 효소생산
- *Bacillus* 균을 숙주로 한 효소유전자의 고분비 발현계 개발
  - *B. thuringiensis* 유래의 SEP promoter 이용
  - dual promoter 및 mRNA 안정화인자 이용
  - plasmid 발현계와 염색체 발현계의 개발
- 변이를 통한 *Bacillus* sp. 79-23 분리균의 cellulase 생산성 제고 및 숙주균 개발
- Molecular evolution을 통한 α-amylase와 cellulase 유전자의 specific activity가 제고
- 내열성 α-amylase의 산업적 생산용 *Bacillus* 균주 개발 및 산업적 생산시험
- 중성 cellulase의 산업적 생산용 *Bacillus* 균주 개발 및 산업적 생산시험

IV. 연구개발 결과

1. *Bacillus* 균주 개발을 위한 기반기술 확립

- 효소생산 숙주로 이용하고자하는 *B. licheniformis*의 경우 geneus *Bacillus*의 type species인 *B. subtilis* 와는 달리 유전자 재조합에 필요한 기반기술이 부족하여 본 연구를 통해 개발하였다.
- Wild type 균주(*B. licheniformis* KCTC2215) 및 변이주(SK2, PN6 등)에 안정되게 적용할 수 있는 vector 및 형질전환 방법을 확립하였다.
- Plasmid vecotr로는 *B. cereus*에서 분리한 pBC16을 모체로 하여 pUBC1을 개발하였고,
- *B. licheniformis*균의 형질전환을 위해서 간편한 electroporation법을 개발하였는데 2×10^5 transformants/㎍ plasmid DNA의 효율을 달성하였다.
- 또한 유용 유전자를 *B. licheniformis*균의 염색체 DNA 내로 도입, 증폭시켜 발현을 안정되게 극대화시키는 기술을 개발하였다.
- 이러한 기술은 본 연구와 관련된 효소생산을 위한 균주개량 뿐만 아니라 *B. licheniformis*를 이용한 다양한 연구에서 이용될 수 있어 그 파급효과가 클 것이다.

2. *Bacillus* 숙주균의 개발

- *B. licheniformis*균, *Bacillus* sp. 79-23균, *B. thuringiensis*균 등을 이용한 효소 생산 숙주균을 개발하였고 79-23균에 대해서는 특허출원 하였음. *B. licheniformis*균을 여러 차례 돌연변이시켜 얻은 PN6는 현장발효시험을 통해 pH변화를 제어하기 용이한 것으로 밝혀져 유용성이 큰 것으로 판단된다.
- 본 연구에서 개발된 *Bacillus* 숙주균은 다른 유용 재조합 단백질의 산업적 생산에 널리 이용될 수 있다.

3. *Bacillus*균 특수 프로모터(SEP)를 이용한 발현시스템 개발

- *Bacillus* 균은 전 세계에서 효소생산을 위한 숙주로서 많이 쓰이고 있다. 그러나 *Bacillus* 균에서 유용효소의 상업적 생산을 위해 사용하는 expression system은 큰비용을 지불하지 않고는 구하기 어렵고 정보입수도 쉽지 않다. 대부분 효소생산회사 내에서 자체

적으로 개발하여 사용하고 있으며 그 내용에 대해서는 비밀로 유지하고 있는 실정이다.

- 본 연구에서는 *Bacillus* 속 균을 숙주로 하고, 포자형성과정 중에 발현되는 특성을 지닌 *B. thuringiensis*균의 독소단백질유전자의 발현시스템(SEP)을 이용하여 효소단백질 고발현시스템을 개발하였다.

- 본 연구의 고발현 시스템은 *Bacillus* 속 숙주균의 배양과정중 대수증식기가 지나고 포자를 형성하는 시기에 목표로 하는 효소유전자를 고발현 시킴으로써 세포의 성장에는 영향을 미치지 않고 효소단백질을 높은 수준으로 생산하며 생산된 효소는 세포 외로 분비되거나 세포의 자가분해(autolysis)에 의해 배양액 중에 노출되어 쉽게 회수할 수 있는 시스템으로 활용가능성이 크다.

4. 섬유가공용효소 생산균주 개발 및 발효공정 최적화

가. Cellulase 생산용 *Bacillus* 균주 개발;

- 앞서 기술한 몇 가지 *Bacillus* 숙주균 및 효소단백질 고발현시스템을 이용하여 현재 2가지 균주를 개발하였다. 하나는 *B. thuringiensis*균을 숙주로 하고 SEP 프로모터와 mRNA 안정화 인자 STAB을 이용하여 개발한 균주(SH845)인데 300units/ml의 생산성에 도달하였다. Cellulase유전자를 cloning 해온 *B. subtilis* 모균의 경우 효소 생산성이 < 0.1units/ml 임을 감안할 때 매우 높은 역가이다. SH845균주를 참여기업에 제공하여 11,000 IU/g의 시작품(분말형태)을 제조하였다.

- 두 번째 균주는 *B. licheniformis*균을 숙주로 하고 α-amylase 프로모터, SEP 프로모터 및 STAB을 지닌 발현시스템에 cellulase유전자를 실어 제작한 균주로 현재 현장에서의 적용시험중이다.

나. α-amylase 생산용 *Bacillus* 균주 개발;

- *B. licheniformis* 변이주 PN6를 숙주로 하고 여기에 α-amylase 자체 프로모터, SEP 프로모터 및 STAB을 지닌 발현시스템에 α-amylase 유전자를 실어 제작한 균주로 현재 실험실 배양조건에서 3,200 units/ml 생산수준(전단계 개발균주의 약 3배)에 도달하였고 이를 참여기업에 제공하여 현장에서의 적용시험을 계속하고 있으며 현재 15,000 units/ml 수준에 도달하였다.

- 단계별 *Bacillus* 개발균주를 참여기업에 여러 차례 제공하여 10,000 L 규모 이상의 생

산시험을 여러 차례 수행함으로써 대량생산을 위한 공정을 최적화하였다.

5. Molecular evolution을 통한 효소의 specific activity증진

- DNA shuffling 방법에 의한 diversity 창출 기술과 cell surface display 방법에 의한 high-throughput screening 기술을 바탕으로 cellulase 및 α-amylase의 specific activity가 각각 5배와 4배 증가된 효소변이체를 개발하였다. evolution된 유전자들을 앞서 개발한 발현시스템에 도입하여 고생산 균주를 제작하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 섬유가공용 효소 고생산성 *Bacillus*속 개발균주를 참여기업에 이전하여 산업화를 추진함으로써 우선 섬유가공용 효소의 수입을 대체하도록 하고 나아가 해외시장으로의 진출을 도모한다.
- 개발균주에 의해서 생산되는 효소의 새로운 용도를 개발하여 섬유산업 뿐만 아니라 제지산업, 식품산업 등과 같이 다량의 효소를 사용하는 다른 산업분야에서 활용될 수 있도록 한다.
- 본 연구에서 개발된 *Bacillus* 균 형질전환 시스템, 돌연변이 기술 및 염색체 상에서의 효소유전자 증폭기술, 유전자 발현시스템 재구성 등 *Bacillus* 균주 개발을 위한 기반기술과 *B. licheniformis*균, *Bacillus* sp. 79-23균, *B. thuringiensis*균 등을 이용한 효소 생산 숙주균 개발 및 효소 고발현시스템 개발 실적은 다른 유용 재조합 단백질의 산업적 생산에 확대 적용하여 고부가가치 단백질의 국내 생산에 활용토록 한다.

여　　　백

SUMMARY

For the development of *Bacillus* strains having high capacity of extracellular enzyme production, basic technologies such as host-vector system, transformation and gene amplification on chromosome have been set up. The plasmid pUBC1 was constructed from a plasmid pBC16 isolated from *B. cereus* as a base and it was introduced successfully into *B. licheniformis* and maintained stably. An electroporation procedure which can give us transformation efficiency of 2 x 10^5 transformants/ plasmid DNA and a gene amplification procedure on chromosome using antibiotic resistance gene were developed in this study.

We used various *Bacillus* species such as *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *Bacillus* sp. 79-23 and *B. subtilis* as hosts for the production of extracellular enzymes. *Bacillus* sp. 79-23, an isolate characterized in this work, showed good productivity of cellulase in a designed medium. *B. licheniformis* PN6 strain which was derived from SK-2 strain by repeated chemical mutagenesis showed very high productivity of α-amylase but very low protease activity. This PN6 strain will also be useful as a host for the production of other kind of extracellular enzymes.

For commercial mass production of useful proteins or enzymes in a *Bacillus* host, development of an efficient expression system is one of the key factors should be settled beforehand. In this study we developed an expression system using *B. thuringiensis cry* promoter. Most crystal protein genes (*cry* genes) are expressed at the sporulation stage of *B. thuringiensis* to a high level; up to 30 % of total cell dry weight, and the expression system constructed using the *cry* promoter was successful to express foreign enzymes such as cellulase, xylanase and α-amylase to high levels. The expression of enzymes was occur only after onset of the stationary phase, so this expression system seems to be especially good for the expression of any protein which has toxic effect to host organism. The high expression of any foreign protein we tested didn't show any harmful effect to the growth of *Bacillus* host cells, and the expressed proteins were secreted into culture medium by natural secretion system

or by autolysis of the *Bacillus* cells.

Using the *cry* expression system, a mRNA stabilizer (STAB) and *B. thuringiensis* host, we have developed a high cellulase producing strain, SH845, which can express a cellulase gene cloned from *B. subtilis* BSE616 up to 300 units/ml. By a mass culture of the SH845 strain we prepared an experimental product (in the shape of powder) of 110,000 IU/g.

Using the *B. licheniformis* PN6 strain as a host and an expression system consisting of self-promoter of α-amylase, *cry* promoter and STAB we developed a high α-amylase producing strain, PN63, which can express α-amylase up to 3,200 units/ml under laboratory culture condition and more than 15,000 under piolot plant culture condition.

On the other hand we tried to develop cellulase and α-amylase genes having higher specific activities by molecular evolution technology. We used error-prone PCR technique to derive diversity of the genes and cell surface display technology for the high-throughput screening of evoluted genes efficiently. In this work we succeeded in getting mutated cellulase genes and α-amylase genes having 5 times and 4 times higher specific activities, respectively.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction 17

Chapter 2 State of the Art Report 21

Chapter 3 Methods and Results 29

Materials and Methods 29

Results and Discussion 43

Chapter 4 Goal achievment 95

Chapter 5 Further applications 97

Chapter 6 References 99

Chapter 7 Development of a *Bacillus* host strain for the production of industrial enzymes using an isolate, Bacillus sp. 79-23, as a mother strain 103

여　　백

목 차

제 1 장 서 론 17

제 2 장 국내외 기술개발현황 21

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 29

제 1 절 연구수행 방법 29

제 2 절 연구수행결과 43

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 95

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 97

제 6 장 참고문헌 99

위탁과제 103

여 백

제 1 장 서 론

환경오염을 근원적으로 줄이고 에너지의 사용을 저감할 수 있는 환경친화적 청정기술의 개발에 있어서 가장 많이 이용되는 소재는 역시 효소이다. 효소의 산업적 응용은 게놈공학과 단백질공학 등 기초학문의 눈부신 발전과 생물공정 분야의 많은 기술들이 개발됨으로써 여러 분야에서 적용이 확대되고 있는데, 섬유산업에서도 근래에 cellulase와 α-amylase의 사용이 크게 증가하고 있다.

면사를 직조하기 전에 직물 제조에 용이하도록 전분을 처리하게 되는데, 이러한 전분은 직물을 염색하기 전에 완전히 제거되어야 한다. α-Amylase는 이러한 직물의 전분을 제거하는데 호발제로서 사용되고 있다. 섬유가공에 사용되는 α-amylase는 대부분이 *Bacillus* 유래의 효소인데, *B. licheniformis*와 *B. stearothermophilus, B. amyloliquefacience* 유래의 내열성 α-amylase가 호발제로써 개발되었다.

한편 청바지 염색에 사용된 indigo를 탈색시키기 위한 stone washing 공정과 면직물의 고품질화를 실현하기 위한 polishing 공정을 cellulase를 이용한 bio-stone washing 공정과 bio-polishing 공정으로 대체하는 기술이 개발되어 cellulase가 섬유가공을 위한 효소로 개발이 되었다. 종래의 경석을 이용한 청바지 탈색작업 공정은 기계적 손상이 클 뿐만 아니라 많은 노동력을 필요로 한다. 그러나 cellulase를 이용한 bio-stone washing 공정은 비용이 저렴할 뿐만 아니라 indigo의 균일한 탈색을 통해서 자연스러운 색상의 실현이 가능해진다. 그리고 bio-stone washing 공정은 직물 내의 잔존 경석을 제거할 필요가 없게 해주고 탈색작업 시간의 감소로 인하여 기계의 처리능력을 20-30% 증가시킬 수 있게 해준다. 그리고 직물에 있는 보푸라기를 제거하는 bio-polishing 공정을 통해서 면직류의 윤택도와 촉감 등을 향상시켜 면직물의 고품질화를 이룰 수도 있다.

이와 같은 섬유가공 목적의 cellulase를 생산하기 위해서 아직까지도 효소 생산균으로서 *Trichoderma*속을 비롯한 곰팡이가 이용되고 있다. 일반적으로 곰팡이 유래의 효소는 산성 cellulase이고 여러 성분의 cellulase가 같이 존재하는데 (1), 이러한 곰팡이 유래의 산성 cellulase로는 indigo의 균일한 탈색이 어려워 청바지에 얼룩이 지는 back-staining 문제점이 발생할 뿐만 아니라 최종면직물의 강도를 저하시키기도 한다. 그런데 *Bacillus*를 비롯한 수종의 세균에 의해서 세포외로 분비되는 중성 cellulase는 곰팡이 유래의 cellulase와는 달리 back-staining과 면직물 강도 저하의 문제를 야기하지 않기

때문에 면직류 가공 공정에 더욱 적합하다. 그러므로 섬유가공용으로 세균 유래의 중성 cellulase가 더욱 선호되고 있으며 그 가격도 곰팡이 효소보다 2~3배 가량 높은 편이다. 그러나 국내의 경우에 곰팡이의 고지배양으로 산성 cellulase를 생산하여 국내 수요량의 약 5% 미만 정도를 충당하고 있고 세균성 cellulase의 생산은 전무한 상태이다. 국내에서도 중성 cellulase의 수요가 계속적으로 증대되고 있음에도 불구하고 덴마크의 Novo Nordisk사에 의해 국내시장이 독점되고 있는 실정이다. 그러므로 섬유가공 공정단계에 더욱 적합한 세균 유래의 중성 cellulase를 대량 생산할 수 있는 효소 생산균의 개발이 절실하게 요구되고 있다.

그런데 *Bacillus*속 균주는 곰팡이와 더불어 여러 종류의 산업용 효소 생산균으로 널리 사용이 되어지고 있는데다가 섬유가공에 적합한 중성 cellulase와 내열성 α-amylase를 생산한다는 관점에서 생각해 볼 때, 섬유가공용 효소 생산를 위한 균주 개발에는 *Bacillus*속 균주들이 적합할 것으로 사료된다. 생물공학 산업에 있어서 *Bacillus* 균주가 유전자 재조합 숙주균으로서 지니고 있는 가장 큰 장점은 재조합 단백질을 효과적으로 세포외로 분비하는 능력이라고 할 수 있는데, *Bacillus*는 산업용 효소 뿐만 아니라 비타민, 항생제, 살충제 등을 비롯한 생리활성 물질과 재조합 단백질의 생산균으로 개발되어지고 있다. 이와 같이 *Bacillus* 균주를 산업용 효소 생산균으로 개발하기 위해서 여러 방법을 이용한 *Bacillus* 균주의 분자육종이 이루어져 왔는데, 주로 유용 단백질의 안정적 생산을 위한 재조합 *Bacillus* 숙주균의 개발과 외래 유전자를 고효율로 분비발현시키기 위한 vector의 개발에 그 연구의 초점이 모아져 왔다. 그 이유는 *Bacillus* 균주를 이용하여 산업용 효소를 생산하기 위해서는 대규모 배양에서도 안정적으로 효소를 대량 생산할 수 있는 균주의 개발이 가장 핵심이 되는 기술이기 때문이다. 국내에서도 *Bacillus*를 이용하여 유용효소를 고수율로 발현 생산하고자 하는 시도가 여러 연구진들에 의해 이루어져왔으나 산업화 수준의 생산성에는 전혀 미치지 못하고 있다. 그런데 선진 외국에서는 유용효소의 산업화를 위한 다양한 종류의 *Bacillus* 숙주-vector계를 개발하고 특허화하여 많은 기술들을 독점 보호하고 있는 실정이다. 특히 효소생산 균주 개발에 관계된 기초 연구결과는 공개되어 있으나 균주 개발에 핵심이 되는 기술들은 Know-How로 보호되고 있으므로, 섬유가공용 효소 생산 균주를 개발하기 위해서는 자체기술 개발이 필요하다고 하겠다. 더군다나 효소생산 공업은 자원이 부족한 국가에 있어서 자원활용이 매우 높은 산업임에도 불구하고 앞에서 언급한 바와 같이 섬유가공용 효소의 대부분을 수입에 의존

하고 있는 국내현실에 비추어 볼때 중성 cellulase와 내열성 α-amylase 생산 균주의 개발이 절실하게 요구된다고 하겠다.

한편 최근 생명공학기술의 급속한 발전은 이제 목적단백질의 활성을 사용자가 원하는 대로 바꾸어주는 작업을 유전자수준에서 가능케 하였다. 이른바 단백질공학은 1993년 노벨화학상 공동수상자인 Michael Smith의 site-directed mutagenesis 기법(2)과 Kary B. Mullis의 polymerase chain reaction (PCR) 기법(3)이 그 기초가 되었다. 지난 세기 말엽부터 등장한 in vitro evolution (시험관 진화) 또는 directed evolution 기술은 이제 그 용도가 점차 넓어져서 거의 대부분의 산업용 효소(단백질)에 적용될 수 있게되었다. 그럼에도 불구하고 이 분야의 국내 연구활동은 아직까지 독자적인 자체기술을 확보하지 못한 실정이다. 20세기형 단백질공학은 미리 디자인된 공정에 따른 단백질이나 또는 해당 유전자의 변형과 그 결과 만들어진 새로운 단백질에 원하는 기능이 계획대로 부여되었는지를 확인하는 것이라면, 21세기형 단백질공학은 무작위적으로 해당 단백질(즉, 유전자)에 돌연변이를 유도한 후 high throughput screening (HTS) 작업으로 원하는 기능이 부여된 변형 단백질을 찾아내는, 이른바 시험관 진화에 의한 방법이라 할수 있다(4). 이러한 시험관진화기법의 필요성은 많은 산업용 단백질(효소)들의 경우 그들이 사용되는 환경은 효소가 자연에서 활동하는 환경과 다른 경우가 대부분이다. 즉, 무작위돌연변이와 재조합 그리고 선택을 통한 자연적 진화과정에서 만들어진 현재 자연계 대부분의 단백질은 주어진 환경 및 조건에서만 최적의 활성을 가지고 있다. 그러나 생물공학산업에서는 인위적 조건에서도 효과적으로 기능을 수행하는, 예컨대 활성을 원하는 만큼 오래 유지시킬 수 있고, 비수용성 조건에서도 활성을 가지며, 나아가 광범위한 기질특이성을 갖는 개량된 단백질을 원하게 된다. 또한 시험관진화 과정에 의해 활성이 개선된 효소의 선별은 대량으로 조제되는 변형유전자의 발현을 효소활성으로 찾아내는 효과적인 방법이 필수적이다. 현재 시험관진화에 의한 단백질공학 기술의 bottle-neck은 결국 효율적인 screening 시스템 확보에 있다고 할 수 있다. 따라서 개선된 활성의 효소를 신속하게 찾아내는 HTS 시스템의 독자적 개발 또한 필수적인 연구분야이다. 이러한 신 개념의 단백질공학에 의해 제조된 효소/단백질은 분리공정과정에서부터 생산성을 증진시킬 것으로 기대되고 있다.

본 연구에서는 이와 같은 연구를 종합하여 섬유가공 용도로서의 반응 특성이 우수한 섬유가공용 효소 유전자원을 확보하고 이들 효소를 산업적 수준으로 고생산하는 재조합 *Bacillus* 균주를 개발하고자 한다.

여 백

제 2 장 국내외 기술개발 현황

Cellulase 효소는 기초 학문적 측면에서뿐만 아니라 응용 측면에서도 많은 연구가 수행되었고 일부는 산업화 되었다. 오랫동안 cellulase의 연구는 섬유소의 당화에 초점이 맞춰져 왔는데, 특히 섬유소 자원의 당화를 통하여 농업 폐기물의 범람으로 인한 문제를 해결하고 운송 연료로서의 gasoline을 ethanol로 대체하려는 시도가 이루어져 오고 있다 (5). 또한 cellulase는 deinking 공정에 의해서 폐지를 재활용하는 데에도 이용이 되고 있고, 저칼로리 식품의 제조와 음식물 쓰레기의 발효, industrial slime의 제거, 사료 첨가제, 세제 첨가제 등의 다양한 용도에 적용이 되고 있으나 아직은 그 시장성이 미약한 편이다. 그런데 세제용 cellulase의 시장은 앞으로 많이 커질 것으로 예상되는 바, 세제용 alkaline cellulase에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며 그 결과들이 특허화 되고 있다.

한편 cellulase는 면직류 가공과 염색제의 균일한 탈색 등의 용도로 섬유산업에서도 유용성이 있으므로 섬유가공을 위한 효소로도 개발이 되었다. 이러한 섬유가공용 효소로서의 cellulase는 전체 cellulase 시장의 많은 부분을 차지하고 있는 실정으로서, 최근들어 급격한 시장 증가를 보였고 앞으로도 지속적인 성장을 할 것으로 예측하고 있다. 그런데 지금까지 섬유가공용 cellulase 생산균으로서 *Trichoderma*를 비롯한 곰팡이가 주로 이용되고 있는데, 곰팡이 유래의 cellulase를 섬유에 처리하게 되면 염료의 back-staining과 면직물 강도 저하의 단점이 생길 수 있기 때문에 이러한 문제점들을 해결하기 위한 효소 조성과 섬유처리 방법에 관한 연구가 많이 이루어져 특허화 되고 있다.

섬유가공에 사용되는 α-amylase는 대부분이 *Bacillus* 유래의 효소로써, 현재까지 *B. subtilis*의 중온성 α-amylase와 *B. licheniformis, B.amyloliquefacience, B. stearothermophilus* 등에서 내열성 α-amylase가 정제되고 그 특성이 밝혀졌다. 이들 균주로 부터 분리된 α-amylase 유전자는 그 염기서열이 결정되어 *B. subtilis*와 *B. brevis, B. amyloliquefacience* 등을 숙주균으로 하여 고분비 발현시킴으로써 고생산성 균주를 개발에 이용하기 위한 연구가 수행되었다. 또한 내열성 α-amylase는 고온에서도 안정한 상태로 반응을 진행시키며 2가의 Ca^{++} 이온을 첨가하였을때 열 안정성이 증가되는 것으로 알려져 있는데, 이와같은 내열성 α-amylase의 열안정성에 관여하는 요인에 대한 연

구도 많이 이루어지고 있다. *Bacillus*를 고생산성 균주로 개량하여 산업화에 성공한 예로는 덴마크의 Novo Nordisk의 내열성 α-amylase와 일본의 Daiwa 내열성 α-amylase 등이 있다.

국내에서도 cellulase와 α-amylase에 관한 연구들이 많이 진행되어져 왔는데, 그 연구의 주된 내용이 여러가지 미생물로 부터 cloning된 유전자의 일차구조를 밝혀내고 유전자 산물의 물리·화학적 성질을 밝혀내는 일에 치중하였다. 또한 이들 효소를 고수율로 발현 생산하고자 하는 시도도 여러 연구진들에 의해 이루어져 왔으나 산업화 수준의 생산성에는 전혀 미치지 못하고 있다. 특히 섬유가공용 중성 cellulase에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

균체 외로 효소를 분비 생산하는 *Bacillus*는 세균성 섬유가공용 효소의 생산균으로 개발될 여지가 충분한데, 실제 유전자 재조합 기술을 통해 *Bacillus*를 산업용 균주로 개발하고자 하는 시도는 효소 생산 차원에서 우선적으로 이루어졌다. 유전자 재조합 숙주균으로 주로 사용되고 있는 *B. subtilis*와 더불어 최근에는 그 숙주범위가 확대되고 있으며, 특히 *B. brevis*를 숙주균으로 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다. 또한 *B. amyloliquefaciens*와 *B. licheniformis*는 산업용효소 생산균주로 오랫동안 발효산업에 이용되어지면서 축적되어진 경험을 토대로 하여 이들 균을 유전자 재조합 숙주균으로 개발하고자 하는 연구가 시도되고 있다. 또한 고온에서의 미생물 발효의 장점을 실현하기 위해서 고온성 *Bacillus* 숙주균을 개발하고자 하는 연구가 *B. stearothermophilus*를 중심으로 이루어지고 있다.

한편, *Bacillus* 숙주균의 생리를 변화시켜 효소 생산성을 높이고자 하는 연구가 이루어지고 있는데, NTG와 같은 mutagen 처리를 이용하는 고전적 육종방법과 효소 생산성과 관련된 주요 유전인자를 발굴·분석하고 이를 직접 조작하는 분자육종 방법으로 체계적인 균주개발이 이루어지고 있다. 특히 *Bacillus* sporulation에 대한 연구결과가 산업균주 개발에 적용이 되고 있는데, 그 이유는 *Bacillus*에서 생산되는 여러가지 세포외 분비효소의 경우에 그 유전자의 발현이 직접 또는 간접적으로 sporulation 과정과 밀접하게 연계되어 일어나기 때문이다 (6, 7). Sporulation에 관여하는 조절단백질의 발현을 조절함으로써 목적하는 유용산물의 생산을 직접 향상시키거나, *Bacillus*균의 생리를 변화시켜 간접적으로 생산성을 증가시킬 수 있다. 이와같은 *trans*-acting regulator를 이용한 고발현 *Bacillus* 숙주와 발현계가 특허화 되는 추세이다. 특히 최근에 4,200 kb에 이르는 *B.*

subtilis 유전체의 전체 염기서열이 밝혀짐에 따라서(8), 지금까지 그 기능이 밝혀지지 않았던 신규 유전자들 중에서 효소 생산성에 관련된 *trans*-acting 조절 유전자원을 밝혀내고 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균주 개발 연구에 적용하려는 시도가 이루어지고 있다.

산업용 *Bacillus* 생산균주를 개발하기 위해서 위와같은 유용 단백질의 안정적 생산을 위한 재조합 *Bacillus* 숙주균의 개발 연구와 더불어서 외래 유전자의 산물을 고효율로 생산, 분비시키기 위한 vector의 개발도 많이 이루어져 왔다. 주로 *Bacillus* 유래의 α-amylase, protease, levansucrase의 promoter 및 signal sequence를 이용한 expression vector의 개발이 많이 이루어져 왔고 그 중 일부는 특허화되어 있다. 또한 *Bacillus* 염색체 DNA로 부터 강력한 promoter 기능을 갖는 DNA 단편들을 cloning하여 expression vector에 적용하기도 하였다. 그러나 대장균과는 달리 *Bacillus*를 숙주균으로 하였을때는 재조합 plasmid의 일부가 생체 내에서 제거되거나 재배열되는 structural instability와 함께 재조합 plasmid가 세포분열시 상실되는 segregational instability가 높은 빈도로 일어나는 취약점이 있다(9). 이러한 plasmid의 불안정성은 *Bacillus* vector로 개발된 대부분의 plasmid가 rolling-circle mechanism 방식에 의해서 복제가 된다는데에 기인한다. 또한 특정 유전자의 과잉발현을 유도하였을 때도 이러한 plasmid의 불안정성은 자주 발생한다.

재조합 *Bacillus*를 산업적으로 이용하기 위해서는 이러한 문제점들은 해결되어야 하므로 이를 위해 *Bacillus* 숙주균 내에서 재조합 plasmid의 안정성을 유지시키려는 시도들이 이루어져 왔다. 일례로 *Bacillus*속 균주로 부터 θ-mode의 복제 방식을 갖는 cryptic plasmid를 분리하여 100 세대 이상 항생제 없이도 안정하게 유지되는 *Bacillus* vector를 개발하기도 하였고, 영양요구성 *Bacillus* 돌연변이체에 숙주가 필요로 하는 영양요구 유전자를 재조합 plasmid에 도입하는 nutritional selection 방법으로 85세대 이상 100%의 plasmid 안정성을 실현하기도 하였다. 또한 특정 유전자의 과잉발현에 의한 plasmid의 불안정성을 해결하기 위해서 재조합 plasmid 내에 *lac* operator, levansucrase 유전자 유래의 sucrose-regulatable expression element, temperature-sensitive element 등을 도입한 induction system을 통하여 외래 유전자의 발현단계를 조절하여 *Bacillus* 숙주균 내에서 재조합 plasmid의 안정성을 유지시키려는 시도들도 이루어져 왔다. 그러나 일반적으로 염색체 상으로 도입된 외래 유전자는 plasmid 상에 있을 때보다 안정성이 훨씬 증가되므로 근본적으로 이러한 plasmid instability를 해결하기 위해서는 외래 유전자를 plasmid DNA 보다는 염색체 DNA 상으로 도입하는 것이 바람직할 것이다. 이를 위해서 상동성

재조합에 의해 외래 유전자를 *Bacillus* 염색체 DNA 내부로 도입한 후에 배지내의 항생제 농도를 증가시키면서 *Bacillus* 균주를 배양하여 염색채 상에 도입된 외래 유전자의 증폭을 유도하는 연구가 이루어져 왔다 (10, 11).

국내에서 *Bacillus*속 균주 개량과 유전자 발현계 개발은 주로 *B. subtilis*를 대상으로 이루어져 왔으며, *B. sphaericus, B. megaterium, B. amyloliquefaciens* 등을 숙주로 사용한 유용물질 생산의 시도도 있었다. 또한 *Bacillus*에서 외래유전자를 과잉발현시키기 위해서 강력한 promoter의 탐색과 이를 이용한 vector의 개발이 이루어져 왔으나, 아직 산업화에 연결시킨 예는 거의 없는 상태이다. 특히 *Bacillus*를 숙주로 사용하여 외래 유전자를 발현시킬때 대부분 plasmid system을 사용하고 있는데, 재조합 *Bacillus* 균주의 발효에서 빈번하게 발생하는 plasmid instabilty의 문제점을 극복하기 위한 시도는 많이 이루어지지 않았다. 그렇기 때문에 유전자 재조합 기술에 의해 개발된 고생산성 *Bacillus*의 발효기술도 재조합 균주의 불안정성 때문에 실험실 단계의 수준에 머물고 있는 실정이다. 또한 여러 세포외 분비효소 유전자의 발현과 밀접한 관계가 있는 *Bacillus*균의 sporulation 과정을 제어하여 생리를 변화시킴으로써 효소 고생산 *Bacillus* 숙주균을 개발하려는 노력은 많지 않았다.

Bacillus thuringiensis 는 그람 양성의 간균으로 포자 형성시 단백질 결정체를 생산하는 특징을 갖는다. *B. thuringiensis*로부터 생산된 단백질 결정체는 곤충에 대해 특이한 살충효과를 나타내어 미생물 살충제 제조시 주요한 활성성분이 된다. *B. thuringiensis* 는 지금까지 80여 종의 아종이 발견되었고, 이들로부터 120여 종에 이르는 독소 단백질 유전자(*cry* genes)가 분리되어 그 염기서열이 밝혀졌다.

*B. thuringiensis*는 적절한 배양조건에서 세포 건체 중량의 25 내지 30%에 이르는 양의 독소 단백질을 생산할 수 있는데, 이와 같이 *B. thuringiensis*가 독소 단백질을 생산하는 기작에 대하여 다양한 연구가 이루어져 왔고 많은 결과가 보고되었다. Wong 등 (12)은 *cry1A* 유전자가 두 가지 프로모터, 즉 BtⅠ과 BtⅡ에 의해 대수 증식기 이후에 연속적으로 전사가 이루어진다는 사실을 밝혔으며, Brown과 Whiteley는 상기 두 가지 프로모터가 *B. subtilis*의 σ^E 및 σ^K와 상동성을 지닌 σ^{35} 및 σ^{28}에 의해서 전사된다는 사실을 보고하였다(13, 14). 전술한 바와 같이 대부분의 독소 단백질 유전자는 유사한 프로모터 구조를 가지고 있다. 이와 같은 프로모터 구조는 포자 형성 중기부터 말기까지 지속적으로 단백질을 발현할 수 있는 능력을 함유하고 있어 *B. thuringiensis*가 많은 양

의 독소 단백질을 생산하는 중요한 원인으로 해석되고 있다. 알려진 독소 단백질 유전자 중 *cry3A* 유전자는 예외적인 경우인데, 상기 유전자는 포자 형성 기작과는 독립적인 σ^A 에 의해 전사가 일어나며 프로모터와 구조 유전자 사이에 전사체를 안정화시키는 염기서열(STAB-SD)이 존재하였다(15). 이와 같이 포자형성 기작과 독립적으로 전사되는 독소 단백질 *cry3A*의 프로모터를 이용한 발현 시스템이 개발되어 미국 특허 제 6,140,104호에 공지되었으며 STAB-SD와 상기 프로모터를 반복적으로 포함하는 발현 조절 시스템 역시 미국 특허 출원 제 5,955,310호에 기재되었다. 그러나 세포성장 정지기에서 포자형성 기작과 연계된 독소 단백질의 프로모터를 이용한 외래단백질의 생산방법은 아직까지 개발되어 있지 않은 상태이다.

상기 '포자형성 기작과 연계된 프로모터' 또는 '포자형성 의존성 프로모터'란 바실러스 균주에서 포자형성 기작의 조절인자인 *spo0A* 유전자가 결핍되면 발현이 일어나지 않는 프로모터를 의미하며 본 연구에서는 이러한 프로모터를 SEP 프로모터로 칭하였다. 이러한 포자형성 기작과 연계된 프로모터를 이용한 외래단백질의 생산방법은 목적 단백질의 과생산으로 인한 세포 성장저해 문제를 해결하고 세포에 독성을 나타내는 단백질의 생산에 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 특별한 발현 유도물질의 첨가 없이도 목적 단백질의 발현을 유도하여 목적 단백질의 생산 단가를 낮출 수 있으며, 발현된 단백질이 세포 외로 분비되거나 세포의 자가분해에 의하여 배양액으로 노출되기 때문에 목적 단백질의 회수가 용이한 장점을 갖는다.

한편, 유용 효소 또는 단백질을 대량으로 발현시키기 위하여 산업 및 농업용 등에서 일반적으로 사용되는 방법은 대부분 돌연변이 유도물질 처리, 자외선 또는 방사선 조사 등을 통해 숙주균을 돌연변이 시키거나, 유전자 조작 방법을 이용하여 한 세포가 가지고 있는 단백질 유전자의 수를 증가시키는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 상기 방법들은 비선택적 돌연변이로 인해 종종 숙주균의 성장속도가 저하되거나, 배지조성 및 배양조건을 최적화시키기 까다로운 경우가 많다. 또한, 돌연변이 균주의 경우에는 균주 퇴화가 일어나는 문제점이 제기되고 있으며, 각각의 목적 단백질의 생산을 위해 서로 다른 단백질 유전자를 포함하는 숙주균을 따로 개발해야 하므로 시간과 노력이 많이 소요되는 고전적인 방법이다. 그 외에도, IPTG 및 당과 같은 특정 발현 유도 인자를 이용하여 발현을 인위적으로 유도하는 방법이 사용되고 있는데, 여기서는 발현 유도 인자의 단가가 생산성에 영향을 미치게 된다. 아울러, 상기 방법에 의해 유용 효소 또는 단백질이 높은

수율로 발현된다 하더라도 이와 같이 생산된 단백질은 세포 내에서 결정체를 형성하게 되어 이를 용해시키는데 많은 어려움이 따른다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 목적 단백질을 세포 외로 분비시키는 방법이 개발되었는데, 이 역시 분비된 많은 효소들이 세포의 성장에 나쁜 영향을 미친다는 문제점이 보고되고 있다.

본 연구에서는 특정 발현 유도 인자가 없이도 유용 효소 또는 단백질을 안정적으로 대량 발현하되 세포의 성장에 영향을 주지 않으면서 발현이 유도되며 생산된 단백질을 효율적으로 회수할 수 있는 발현 시스템을 개발하고자 노력한 결과, *B. thuringiensis* 유래 SEP 프로모터를 이용한 발현 조절 시스템을 개발하였고, 상기 발현 조절 시스템을 이용하여 내생포자를 형성하는 세균으로부터 목적 단백질의 발현을 조절하여 궁극적으로 대량 생산할 수 있음을 확인하였다.

한편 여러 가지 방법을 사용하여 효소의 생산성을 개선하는 것 못지 않게 중요한 것이 효소 자체의 성능을 개선하는 일이다. 이를 위해서는 크게 두 가지의 기술이 필요한데 하나는 효소유전자를 돌연변이 시켜 다양성이 매우 큰 유전자 변이체 pool을 만드는 것이고 다른 하나는 이로부터 개선된 특성을 지닌 원하는 변이 유전자를 골라내는 기술이다. 시험관 안에서 다양한 효소자원을 확보하는 방법으로 기존의 효소에 변이를 유도하여 mutant library를 구축하고 이로부터 목적에 맞는 효소를 선별하는 방법이 매우 효율적이다. 여러 가지 방법 중 미국의 Maxygen 사에서 개발한 DNA shuffling 방법이 가장 효율적으로 다양한 변이효소의 library를 구축할 수 있는 것으로 인식되고 있다. Maxygen에서 개발한 일련의 기술은 다음과 같이 특허로 등록되어 있다.

미국 특허 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, 5,837,458, 6,165,793

이와 같이 특허로 등록되어 있기 때문에 이 기술을 산업적 목적으로 사용 할 경우 비싼 기술료를 지불하거나 Maxygen의 허가 하에서만 가능하다. 따라서, 다양한 효소자원의 효율적인 확보나 효소의 기능을 목적에 맞게 개량하기 위해서는 DNA shuffling방법과 비교할 만한 새로운 방법을 개발하거나, 특허 사용료를 지불하거나, error-prone PCR 과 같은 기존의 방법을 활용하는 것이 가능하다. 최근 몇몇 기업에서 유사한 기술을 개발하여 특허 출원 중이나 Maxygen 사의 기술을 능가하는 기술은 없는 것으로 평가되고 있다. 앞으로 Maxygen사가 개발한 방법은 기존의 효소 및 새로운 효소를 창출하는데 매우 효율적으로 활용될 수 있기 때문에 이를 이용한 신기능 효소개발에 많은 연구가 진행될 것이다. 특히, 효소를 이용한 정밀 화학·의약품 생산 공정이 기존의 화학 공

정에 비해 환경 친화적이고 경제적이라는 결론에 도달함에 따라 선진국의 화학 및 제약 회사들이 효소를 이용한 공정 개발에 막대한 투자를 하고 있다. 이런 상황에서 산업적 목적에 맞는 신 기능 효소의 창출은 매우 중요한 요소가 될 것이고 이에 따라 효소의 in-vitro evolution 기술이 크게 각광을 받을 것이다. 이런 이유로 선진국의 기업들이 보다 효율적인 효소의 in-vitro evolution 기술을 개발하기 위해 집중적인 연구를 진행시킬 것으로 예측된다.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 재 료

가. 사용균주와 플라스미드

본 연구에서 사용한 균주 및 plasmid를 Table1 과 Table2 에 각각 정리하였다. 전단계 연구에서 얻은 내열성 α-amylase (AmyL) 생산용 변이주 *B. licheniformis* SK-2 균주와 중성 cellulase 생산용 분리주 *Bacillus* sp. 79-23를 중심으로 균주개발을 수행하였다. 그리고 *B. thuringiensis* 균, *B. subtilis* 168 균 및 *B. cereus* 균등을 유전자 재조합을 위한 숙주균으로 사용하였다. 또한 유전자 재조합을 위한 중간 숙주균으로는 *E. coli* DH5α를 주로 사용하였다.

나. 배 지

본 연구에서 사용한 각종 배지를 Table3 에 정리하였다. 실험에 사용한 균주들에 따라 배지를 달리하여 사용하였는데, *E. coli* 배양을 위해서는 LB 배지 (Bacto-tryptone, 10 g; yeast-extract, 5 g; NaCl, 5 g; water per liter)를 사용하였고 *Bacillus* 균주의 일반적 배양에는 LB 배지와 Difco에서 구입한 Brain Heart Infusion (BHI) 배지를 주로 사용하였다. 그리고 *Bacillus*를 위한 최소배지로는 Spizizen의 최소배지 (SpC)를 사용하였다 (16). *Bacillus*의 형질 전환을 위한 배지로는 액체 배양을 위해 1x PAB + 0.1% glucose배지를 사용하였고, 형질전환체를 선별하기 위해서 DM3 배지를 사용하였다. 또한 protopast를 형성하고 유지 하기 위한 용액으로 2X SMM(1M sucrose, 0.04M sodium maleaate, 0.04M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; pH6.5) 와 4XPAB가 동일 양 포함된 SMMP와 40%PEG sol'n(10g polyethyleneglycol 6000; 1XSMM, 25 ㎖)을 사용하였다.

2. 방 법

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strains	Descriptions
E. coli DH5α	cloning host
E. coli JM110	cloning host(dam, dcm)
B. subtilis 168	*trp*
B. subtilis JH642	
B. cereus 6E1	BGSC분양
B. licheniformis KCTC2215	wild-type strain
B. licheniformis SK2	thermostable α-amylase hyper-producing mutant
B. licheniformis SK200	thermostable α-amylase hyper-producing mutant SK2 균의 염색체상에 α-amylase 유전자 도입 증폭
B. licheniformis SM2 *B. licheniformis* SM21 *B. licheniformis* SM211	thermostable α-amylase hyper-producing mutant derived from SK2
B. licheniformis SKC	SK2 균의 염색체상에 cellulase 유전자 *celBS* 도입
B. licheniformis PN6	thermostable α-amylase hyper-producing mutant derived from SM211
B. licheniformisv PN62	*B. licheniformisv* PN6 containing pUBA62
B. licheniformisv PN63	*B. licheniformisv* PN6 containing pUBA63
B. t. subsp. *kurstaki* 4D11	cry(-), BGSC분양
B. t. subsp. *israelensis* 4Q7	cry(-), BGSC분양
B. thuringiensis SH845	*B. t.* 4D11+P_{cry1Ca}+STAB+*celBS*

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmids	Descriptions
pUB110	Cloning vector for *Bacillus* (Km^r)
pBC16	Cloning vector for *Bacillus* (Tc^r)
pSI7	Integration vector for *Bacillus* (Ap^r, Km^r)
pSI7-S	Integration vector containing *celS* gene (Ap^r, Km^r)
pSI7 α	Integration vector containing amyL gene (Ap^r, Km^r)
pUBC1	*E. coli-Bacillus* shuttle vector (Ap^r, Tc^r)
pUBC2	*E. coli-Bacillus* shuttle vector (Ap^r, Tc^r)
pHPS19	pHPS9 vector plasmid의 mcs보강
pHPS20	pHPS19+T_{cry1Ac}
pSPC100	pHPS20+*celBS*
pCPa4	Expression vector, pHPS20+P_{cry1Aa}
pCPaC1	pHPS20+P_{cry1Aa}+*celBS*
pCPaC2	pHPS20+P_{cry1Aa} derivative+*celBS*
pCPaC3	pHPS20+P_{cry1Aa} derivative+*celBS*
pCPaC3ds	pHPS20+P_{cry1Aa} derivative+*celBS*
pCPaC3xs	pHPS20+P_{cry1Aa} derivative+*celBS*
pCPkC4	pHPS20+P_{cry1Ka}+*celBS*
pCPcC5	pHPS20+P_{cry1Ca}+*celBS*
pCPaA1	pHPS20+P_{cry1Aa}+*amyE*
pCPaX1	pHPS20+P_{cry1Aa}+*xynA*
pUBC40	pUBC2+P_{amyL}+*celBS*
pUBC41	pUBC2+P_{amyL}+P_{cry3}+STAB+*celBS*
pUBA62	pUBC2+*amyL*
pUBA63	pUBC2+P_{cry3}+STAB+*amyL*
pSHC337	pHPS9+P_{EB}+P_{amyL}+*celBS*
pSHC338	pHPS9+P_{EB}+P_{amyL}+*celBS*
pSHC339	pHPS9+P_{EB}+P_{amyL}+*celBS*

Table 3. 대장균 및 *Bacillus*균 배양을 위해 사용한 배지

배 지	조성 및 용도
LB	1% Bacto-tryptone, 0.5% NaCl, 0.5% yeast-extract *E. coli* 배양
TBAB	Tryptose blood agar base (Difco) *Bacillus* 균의 일반 고체배양
BHI	Brain Heart Infusion (Difco) *B. licheniformis* 배양
BPL	0.5% Beef extract. 1% Bacto-peptone, 5% lactose *B. licheniformis* 배양
LBSP	Bacto tryptone, 10 g; Bacto yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g; sucrose, 250 mM; potassium phosphate buffer, 50 mM (pH 7.2) per 1liter *B. subtilis* electroporation용 cell 제조
SW2.0	2% 대두분. 5% lactose, 0.1% Bacto-peptone 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균 배양
skim milk(1%) 배지	BHI 고체배지에 1% skim milk를 첨가하여 사용 protease 활성균주 선별
starch(5%) 배지	BHI 고체배지에 5% soluble starch를 첨가하여 사용 α-amylase 활성균주 선별
DM3 배지	4% agar 200mℓ; 1M-sodium succinate(pH7.3) 500mℓ; 5% casamino acids 100mℓ; 10% yeast estract 50mℓ; 1.5% KH2PO4 100mℓ; 3.5% K2HPO4 100mℓ;.20% glucose 25mℓ; 1M MgCl2 20mℓ; filtered 2%BSA 5mℓ; per liter protoplast trasformation시 regeneration 배지로 사용
PAB (penassy broth)	Difco-nutrient broth, 4g; Peptone, 2.5g; yeast-extract, 1.5g; NaCl, 3.5g; KH_2PO_4, 1.32g; K_2HPO_4, 3.68g per liter *Bacillus* 형질전환용 cell 배양
DM3	4% agar, 200mℓ; 1M Na-succinate(pH 7.3), 500mℓ; 5% casamino acids, 100mℓ, 10% yeast-extrasct, 50mℓ; 1.5% KH_2PO_4, 100mℓ; 3.5% K_2HPO_4, 100mℓ; 20% glucose, 25mℓ; 1M MgCl2, 20mℓ; filtered 2% BSA, 5mℓ *Bacillus* 형질전환체 선별

가. Chemical mutagenesis에 의한 α-amylase 고생산균주 개발

NTG(nitrosoguanidine)을 사용한 돌연변이는 다음과 같은 절차를 따라 행하였다.

1. 종배양: LB배지 2.5ml을 담은 test tube에 돌연변이유도 대상 *Bacillus*균주를 접종하여 37℃, 250rpm, 9.5시간 진탕배양 한다.
2. 본배양: 신선한 LB배지 2.5ml을 담은 test tube에 종배양액 100㎕를 접종하여 37℃, 250rpm, 5시간 배양한다.
3. 배양액을 1.0ml씩 3개의 Eppendorf tube에 분주한다(1개는 control용)
4. NTG처리;

   A tube : final 60 g/ml 되도록 첨가

   B tube : final 100 g/ml 되도록 첨가

   C tube : 무첨가 control
5. 실온(약 26℃)에서 6분간 방치한다.
6. 원심분리하여 cell pellet을 얻는다 (micro centrifuge, 4℃, 3분, 7000rpm)
7. Cell pellet을 1.0ml LB에 현탁하여 다시 cell pellet을 원심분리한다.
8. Cell pellet을 1.0ml LB에 현탁한다.
9. Cold LB를 사용하여 10^{-1} ~10^{-6} 희석한다
10. 100㎕씩 LB plate (Rm 5ug/ml, 0.5% skim milk)에 spreading 한다.

나. 일반적인 DNA조작

(1) Chromosomal DNA 및 plasmid DNA 분리

E. coli 와 *Bacillus* 균주로 부터의 재조합 플라스미드의 분리는 Birnboim과 Doly의 alkaline lysis 방법(17)을 사용하였으며 *B. licheniformis*로부터의 chromosomal DNA는 Tait가 사용한 방법을 사용하여 분리하였다. 균주의 배양은 *E. coli* 는 LB 배지를 *B. licheniformis* 는 BHI 배지를 주로 이용하여 배양하였다.

(2) 제한효소에 의한 DNA digestion, ligation, polymerase chain reaction 등은 시약공급원이 제공하는 방법에 따라 수행하였다.

다. *Bacillus* 숙주균의 형질전환

(1) *Bacillus licheniformis*균의 형질전환

가) Electroporation법에 의한 형질 전환

B. licheniformis 균주를 형질전환시키기 위해서 electroporation 방법을 사용하였다. *B. licheniformis*를 3 mℓ의 BHIS broth (0.25 M sucrose를 포함하는 BHI 배지)에 접종하여 30℃에서 overnight 진탕배양한 후에 200 mℓ의 BHIS 배지에 1%되게 접종하였다. 30℃ 에서 OD_{600} 값이 0.5 (초기 대수기에 해당)가 될때까지 진탕배양한 후에 얼음 위에 30분간 방치하였다. 원심분리하여 얻은 균체들을 200 mℓ의 ice-cold SM용액(0.25 M sucrose, 2mM $MgCl_2$)으로 세번 세척한 후에 0.2 mℓ의 ice-cold SM buffer에 균체를 현탁시켰다. *B. licheniformis*의 형질전환을 위해서 50μℓ의 eclectroporation cell과 약 1μg의 DNA를 완전히 섞은 후에 0.2 cm electroporation cuvette 으로 옮겨서 얼음에 정치해두었다. 7.5 kV/cm, 25μF capacitence, 400Ω resistance 의 조건으로 pulse를 준 후에 1 mℓ의 BHI 배지를 첨가하고 37℃ 에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 그리고 나서 1 μg/mℓ의 tetracycline이 들어있는 BHI agar 배지에 도말하여 37℃ 에서 overnight 배양을 하였다.

나) Protoplast법에 의한 형질전환

B. licheniformis PN6의 형질전환은 Chang과 Cohen의 protoplast법(18)을 사용하였다. BHI borth 3mℓ에 PN6 균주를 접종하여 37℃에서 overnight 진탕배양한 후에 25 mℓ의 PAB 배지에 1%되게 접종하였다. 37℃ 에서 OD_{540} 값이 0.5 정도 될 때까지 진탕배양한 후에 원심분리하여 얻은 균체들을 4 mℓ의 SMMP용액 (1 volume 2 x SMM, 1volume 4 x PAB)으로 두 번 세척한 후에 lysozyme(20mg/mℓ)을 포함하는 SMMP 0.5 mℓ로 균체를 현탁시켜 37℃에서 1-1.5hr(90~100% protoplast 형성) 교반 반응시킨다. 4000rpm에서 4℃로 10min 동안 원심분리하여 얻은 protoplasts를 4 mℓ SMMP 용액으로 2번 세척 후 마지막으로 0.5 mℓ SMMP로 현탁시킨다. 이 protoplsats 용액에 plasmids 100ng~1μg 과 1.5 mℓ 40%PEG sol'n를 완전히 섞은 후 R.T에서 2분간 반응시킨다. 5 mℓ SMMP 용액을 첨가하여 원심분리한 후 1 mℓ SMMP용액에 현탁시켜 37℃에서 1hr 반응시키고 나서 Tetracylin (1μg/mℓ)이 포함된 DM3 배지에 도말하여 42℃에서 2-3일간 배양하였다.

(2) *Bacillus subtilis* 균의 형질전환

B. subtilis 균의 형질전환은 natural competency를 이용하는 방법과

electroporation 방법 두 가지를 사용하였다. Competence cells의 준비와 형질전환은 Albano 등의 방법을 따랐고(19), electroporation cells의 준비 및 형질전환은 Bron의 방법(20)을 따라 다음과 같이 하였다; 50 mℓ의 LBSP 배지 (Bacto tryptone, 10 g; Bacto yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g; sucrose, 250 mM; potassium phosphate buffer, 50 mM (pH 7.2) per 1liter)에 *Bacillus* 콜로니를 접종하여 37℃ 에서 대수증식기 말기까지 진탕 배양한 후에 200 mℓ의 LBSP 배지에 10 mℓ의 LBSP 배양액을 다시 접종하였다. 37℃ 에서 대수 말기까지 진탕 배양한 후에 원심 분리하여 얻은 균체들을 200 mℓ의 ice-cold SHMG (sucrose, 250 mM; Hepes, 1 mM; $MgCl_2$, 1 mM; glycerol, 10% (w/v); pH 7.0)로 세번 세척하였다. 1.5 mℓ의 ice-cold SHMG 에 균체를 현탁시켜서 0.5 mℓ 씩 분주하여 -80℃ 에서 보관하였다. *B. subtilis* 형질전환을 위해서 -80℃ 에서 보관해두었던 0.5 mℓ의 eclectroporation cells을 꺼내어 재빨리 녹인 후에 1㎍의 plasmid를 섞어서 0.2 ㎝ electroporation cuvette 에 옮긴 후, 0℃ 에서 20분 동안 방치하였다. 12.5 kV/cm, 25 ㎌의 조건으로 pulse를 준 후에 4.5 mℓ의 LBSPG 배지 (LBSP + 10% (w/v) glycerol)를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 진탕배양 하고 나서 적당한 항생제가 들어있는 agar 배지에 도말하였다.

(3) *Bacillus thuringiensis* 균의 형질전환

*B. thuringiensis*균의 형질전환 방법으로는 elctroporation 방법을 이용하였다. electroporation Cell의 준비단계는 BHIS(BHI+ 0.5M sucrose)배지 3mℓ에 *Bacillus thuringiensis* 균을 접종한 후 16시간 이상 30℃, 200rpm 이상에서 진탕배양하였다. 다음날, BHIS(BHI+ 0.5M sucrose) 100mℓ에 전날 배양한 seed 100㎕를 접종하고 OD_{600}=0.15~0.18 이 될 때까지 30℃, 200rpm 이상에서 shaking incubation한 후, ice에서 15~20 min간 정치 시켰다. 정치 후 수득한 cell을 cold-EB(0.4M sucrose, 1mM $MgCl_2$)buffer로 2번 washing하였고 다시 cold-EB buffer 900㎕와 glycerol 100㎕로 resuspending하여 준비하였다. Electroporation에 의한 형질전환 과정은 제조한 electroporation용 cell 500㎕과 DNA sample(1~5㎍)을 섞어 ice에 15~20 분간 방치한 후 cold-electroporation cuvett에 sample을 넣고 pulse(2.5kV, 25㎌, 400Ω)를 주고 바로 BHIS 2mℓ에 transfer한다. 30℃에서 180~190rpm 으로 2~3 시간 incubation 한 후, TBAB에 적합한 항생제를 넣고 600~700㎕씩 도말하여 30℃에서 정치 배양한다.

라. *B. licheniformis*균 염색체 내로의 유전자 도입 및 증폭

도입하고자 하는 유전자를 함유하는 integration용 plasmid로 *B. licheniformis*를 형질전환 시킨 다음 항생제(kanamycin) 농도를 점차적으로 높여가면서 *Bacillus* 균의 염색체 상에서 해당 유전자가 증폭이 된 새로운 *Bacillus* 형질전환체를 선별하는 과정을 거쳤다. 먼저, SpC 최소배지 내의 kanamycin 농도를 20 μg/mℓ에서 100 μg/mℓ로 점차적으로 높여가면서 37℃에서 진탕 배양을 하였다. 다음에는 kanamycin 100 μg/mℓ 농도의 고체배지에서 자란 형질전환체를 가지고 kanamycin 농도를 200 μg/mℓ에서 3 mg/mℓ로 점차적으로 높여가면서 37℃에서 다시 진탕 배양을 한 후 kanamycin 농도를 200 μg/mℓ의 고체배지에 spreading하여 잘 자라는 colony를 선택하였다.

마. 고체배지 상에서의 돌연변이주 또는 형질전환주의 효소활성 비교

(1) Cellulase

Cellulase 유전자를 도입한 형질전환체 또는 활성이 증가된 돌연변이주를 선별하기 위해서 0.5% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC), 0.005% (w/v) trypan blue와 적당한 항생제를 함유한 LB agar 평판배지에 도말하여 37℃ 에서 overnight 배양을 하였다. 그 후에 LB 평판배지에 자란 콜로니 주위에 CMC 분해환이 생긴 콜로니들을 선별하였다.

(2) α-amylase

α-amylase 유전자를 도입한 형질전환체 또는 활성이 증가된 돌연변이주를 선별하기 위해서 5%(w/v) soluble starch와 항생제를 함유한 BHI 평판배지에 도말하여 37℃에서 overnight 배양을 하였다. 그 후에 평판배지에 자란 콜로니 주위에 Starch 분해환이 생긴 콜로니들을 선별하였다.

(3) Protease

Protease 유전자를 도입한 형질전환체 또는 활성이 증가된 돌연변이주를 선별하기 위해서 1%(w/v) Skim milk와 항생제를 함유한 BHI 평판배지에 도말하여 37℃에서 overnight 배양을 하였다. 그 후에 평판배지에서 자란 콜로니 주위에 Skim milk 분해환이 생긴 콜로니들을 선별하였다.

바. 효소의 역가 측정

(1) α-Amylase 역가 측정

α-Amylase 활성은 Miller의 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 이용하여 전분에서 생성되는 환원당을 측정하였다(21). 기질로 감자 전분을 다음과 같이 전처리 하여 사용하였다. 감자 전분을 2 N NaOH 용액에 현탁 시킨 후 실온에서 4시간 동안 방치하고 물을 첨가하여 완전히 녹였다. 여기에 2 N HCl 용액을 첨가하여 pH 7.0 이 되도록 하고 최종적으로 물을 첨가하여 0.2% (w/v) 전분 용액을 제조하였다. 효소 반응은 위에서 만든 기질을 500㎕. 50mM potassium phosphate buffer(pH6.5)로 10^{-4} dilution한 효소액 50㎕와 200㎕의 D.W 그리고 0.2M potassium phosphate buffer(pH6.5) 250㎕를 섞어 60℃에서 15분간 반응 시켰다. 그 후에 DNS 시약을 3㎖ 넣어 잘 섞어준 다음 100℃에서 5분간 boiling 하였다. 그 후에 잘 식힌 sample은 A_{540}에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도 1 unit는 위의 조건 하에서 1분 동안 기질인 전분으로부터 1 μmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질 정량은 Lowry 방법에 의해 결정하였다.

(2) Cellulase 및 xylanase 역가 측정

Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여, 자일란아제 역가 측정을 위한 기질로는 자일로오즈(xylose)(Sigma X-0627, U.S.A) 1% 용액을 사용하여 효소 반응 후에 유리되는 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0% (w/v) CMC 용액 0.5 ㎖와 200 mM Photasium phosphate buffer (pH 6.5) 0.25 ㎖와 효소 용액 0.25 ㎖를 혼합하여 50 ℃에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ㎖을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 glucose를 표준시료로 사용하여 얻은 흡광도의 표준곡선과 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 기질인 CMC로 부터 1 μmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 흡광도가 0.7보다 큰 값을 갖는 경우 0.3~0.7의 값을 갖도록 50mM Photasium phosphate buffer (pH 6.5)로 희석한 효소용액 0.25 ㎖를 혼합하여 반응시켰다.

$$units = \frac{(1.127\times O.D_{540}+0.241)\times (\text{희석배수})^{-1}\times 1000}{t\times v}$$

(t. time of the reactionin minutes; v, volume of the cell extracts used in the assay)

사. Molecular evolution에 의한 효소유전자 개량

(1) Substrate plasmid preparation

실험에 이용한 cellulase 유전자 *celBS* (GenBank accession number D01057, 1.3 kb)는 *Bacillus subtilis* BSE616에서 유래한 것으로서 Inp 발현 벡터에 XmaI/HindIII site에 CMCF1 primer와 CMCF2 primer를 이용하여 클로닝하였다 (Fig. 1). CMCF1과 CMCF2 primer의 염기서열은 각각 5'-GCA TCA GCA CCC GGG ACA AAA ACG-3'과 5'-GCT CGG TAC AAG CTT ATC ATA TAA-3'이였다. α-amylase의 경우 amyL1 (5'-CGCATATGAAACAACAAAAACGGCTTTACGC-3') 및 amyL2 (5'-CGGGATCC CTATCTTTGAACATAAATTGAA AC-3')를 이용하여 *Bacillus licheniformis*로부터 PCR을 이용하여 클로닝하였다.

(2) Error-prone PCR

Error-prone PCR은 정확도가 가장 떨어지는 재조합 Taq polymerase를 이용하여 수행하였으며, template는 효소 유전자가 cloning된 pYSK3 plasmid를 이용하였다. Primer는 INP의 C-말단 부위에 결합하는 YSK-5 (5'- GAT ATT GTC GAT AAA CCC GAC GAG -3')와 M.C.S.의 downstream에 결합하는 YSK-6 (5'- GAT TTA ATC TGT ATC AGG CTG AAA -3')를 이용하였다. Error frequency를 다양하게 하기 위하여 Mn^{2+} 농도와 dNTP 농도를 달리하여 1000 bp당 2개에서 8개정도의 error가 생성되도록 하는 조건으로 행하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분간 가열 후, 94℃에서 1 분, 68℃에서 1분, 94℃에서 1분 반응을 25회 반복 후, 72℃에서 5분간 반응을 더 시킨 후, 4℃로 온도를 낮추어 반응을 종결시켰다.

(3) Amplification of error-generated genes

Error prone PCR products를 정제한 후 이를 template로 하여 YSK-5, YSK-6 primer를 이용한 2차 PCR을 행하였다. Primer들은 50 uM의 농도가 되도록 하였으며, Taq polymerase가 포함된 AccuPower PCR premix(Bioneer, Korea)를 이용하였다. PCR 조건은 일반적인 방법대로 95℃에서 1분간 가열 후, 94℃에서 1 분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분 반응을 32회 반복 후, 72℃에서 5분간 반응을 더 시킨 후, 4℃로 온도를 낮추어 반응을 종결시켰다. PCR 산물의 반은 바로 INP 발현벡터에 cloning하여 라이브러리의

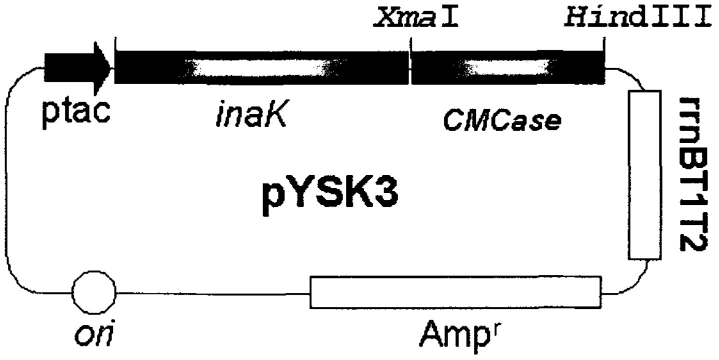


Fig. 1. Inp/CMCase fusion protein display용 plasmid

제조에 이용하였으며, 나머지는 GFL-I에 이용하였다.

(4) GFL-I

Error-prone PCR을 통해 합성된 효소 변이 유전자들을 수개의 조각으로 fragmentation 시킨 후, reassembly 과정을 통하여 원래 크기의 효소유전자로 재조합하였다. 재조합된 유전자들은 다시 YSK-5,6 primer들을 이용하여 증폭하였으며, 이를 INP 발현벡터에 클로닝하여 대장균 디스플레이 라이브러리를 구축하였다.

(5) Display library construction

INP 발현 벡터와 효소 유전자 라이브러리를 XmaI과 HindIII (New England Biolabs Ltd., England)로 절단한 후 high pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)으로 정제하였다. 라이게이션을 위하여 벡터와 효소 변이유전자를 1:4의 몰비로 혼합한 후, 5 U의 라이게이즈를 이용하여 전체 10 ul 부피로 25℃에서 12시간 반응시켰다. 이 후 대장균 JM109에 형질전환시켜서 100 ug/ml의 ampicillin이 포함된 LB/Amp배지 (Luria-Bertani, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) bacto tryptone, 0.5% (w/v) NaCl)에서 형질전환된 대장균 라이브러리를 얻었다. 변이유발 피시알을 행한 이후 바로 벡터에 클로닝하여 제조한 라이브러리를 EPL이라 명명하였으며, reassembly를 거친 후 제조한 라이브러리를 GFL-1A라 명명하였다. 두 라이브러리의 규모는 모두 약 10^5이였다. 각각의 대장균 라이브러리로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 -20℃에 보관하였으며, 분자진화된 돌연변이 탐색시 새로운 대장균 JM109 competent cell에 형질전환시켰다. 형질전환체는 LB/Amp배지에서 37℃에서 16시간동안 진탕배양시켰으며, 이를 다시 LB/Amp 배지에 적당량 희석하여 탐색 배지에 도말하여 활성이 증가된 변이 효소를 표면발현한 형질전환체를 탐색하였다.

(6) Growth-linked screening

제조한 효소 라이브러리 표면발현 대장균들을 0.5% (w.v) substrate, 1 mM IPTG (Sigma, U.S.A.), 100 ug/ml thiamine (Sigma, U.S.A)를 포함하는 M9 최소배지에 도말한 후 25℃에서 배양시켰다. 표면에 발현된 변이 효소의 비활성이 높을수록 고체배지에 유일하게 존재하는 기질을 빨리 분해하여, 생산되는 글루코스를 탄소원으로 이용할 수 있으

며, 생육속도도 상대적으로 빠르기 때문에 고체배지 상에 상대적으로 큰 콜로니로 나타난다. 상대적으로 크기가 큰 300여 콜로니들을 활성탐색 배지에 재접종하고, 콩고레드(congo-red)를 이용한 염색법(Park, S.H. and Pack M.Y. 1986 Enzyme Microb. Technol. 8:725-728)으로 효소 활성을 간접적으로 확인하였으며, 그중 활성환이 크게 나타난 것들 50 클론들의 전세포 효소 활성을 DNS법으로 측정하였다.

(7) Halo-linked screening

0.05% (w/v) 트립판 블루(trypan blue, Sigma, U.S.A.), 1% substrate, 100 ug/ml ampicillin을 포함하는 LB 아가 배지에 효소를 표면발현한 대장균을 배양시키면 콜로니 주변에 상대적으로 투명한 환이 생성된다. 이때 표면발현된 효소의 활성이 클수록 환은 빠르게 생생되며, 결과적으로 환의 크기도 상대적으로 크게 나타난다. EPL, GFL1A 라이브러리와 parent 효소 발현 대장균을 LB배지에 도말한 후 parent 효소보다 환이 빠르게 생성되는 약 150 클론들를 선별하였으며, 상기한 바와 같이 전세포 활성을 DNS법으로 측정하였다.

여 백

제 2 절 연구수행 결과

1. *Bacillus* 균주 개발을 위한 기반기술 확립

효소생산 숙주로 이용하고자 하는 *B. licheniformis*의 경우 geneus *Bacillus*의 type species인 *B. subtilis* 와는 달리 유전자 재조합 등 균주개발에 필요한 기반기술이 크게 부족하여 본 연구를 통해 많은 부분 개발을 하였다. 우선 wild type 균주 *B. licheniformis* KCTC2215 및 변이주(SK2, PN6 등)에 안정되게 적용할 수 있는 vector 및 형질전환 방법을 확립하였다. Plasmid vecotr로는 *B. cereus*에서 분리한 pBC16을 모체로 하여 pUBC1을 개발하였고, *B. licheniformis*균의 형질전환을 위해서는 비교적 간편하면서 효율이 좋은 electroporation법을 개발하였는데 이 방법에 의해 2×10^5 transformants/㎍ plasmid DNA 의 효율을 달성할 수 있었다. 이와 함께 integration vector pSI7 plasmid를 이용하여 유용 유전자를 *B. licheniformis*균의 염색체 DNA 내로 도입, 항생제 저항성 기작을 이용하여 해당 유전자를 증폭시켜 발현을 안정되게 극대화시키는 기술을 개발하였다. 이러한 기술은 본 연구와 관련된 섬유가공용 효소생산을 위한 균주개량 뿐만 아니라 *B. licheniformis*를 이용한 다양한 연구에서 이용될 수 있어 그 파급효과가 클 것이다.

2. *Bacillus* 숙주균의 개발

산업용 효소의 대량생산을 위해서는 효소유전자의 고발현을 위한 발현시스템 구축도 중요하지만 이 발현시스템을 장착할 숙주균의 개발도 매우 중요하다. 본 연구에서는 *B. licheniformis*균, *Bacillus* sp. 79-23균, *B. thuringiensis*균 등을 효소 생산 숙주균으로 활용하고자 시도하여 각 경우 모두 기대수준 이상의 성과를 거두었고 본 연구팀이 자연계에서 직접 분리하여 개발한 *Bacillus* sp. 79-23균에 대해서는 특허를 출원하였다. *B. licheniformis*균을 여러 차례 돌연변이시켜 얻은 PN6 균은 현장발효시험을 통해 대량배양 과정중의 pH변화를 제어하기에 용이한 것으로 밝혀져 향후의 활용가능성이 큰 것으로 판단된다. 본 연구에서 개발된 *Bacillus* 숙주균은 다른 유용 재조합 단백질의 산업적 생산에도 널리 이용될 수 있을 것이다.

3. *B. thuringiensis*균 유래 SEP promoter를 이용한 효소발현시스템 개발

유용 효소 또는 단백질 고생산균주 개발을 위하여 일반적으로 사용되는 방법은 대부분 돌연변이 유도물질 처리, 자외선 또는 방사선 조사 등을 통해 숙주균을 돌연변이 시키거나, 유전자 조작 방법을 이용하여 한 세포가 가지고 있는 단백질 유전자의 수를 증가시키는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 상기 방법들은 비선택적 돌연변이로 인해 종종 숙주균의 성장속도가 저하되거나, 배지조성 및 배양조건을 최적화시키기 까다로운 경우가 많다. 또한, 돌연변이 균주의 경우에는 균주 퇴화가 일어나는 문제점이 제기되고 있으며, 각각의 목적 단백질의 생산을 위해 서로 다른 단백질 유전자를 포함하는 숙주균을 따로 개발해야 하므로 시간과 노력이 많이 소요되는 고전적인 방법이다. 그 외에도, IPTG 및 당과 같은 특정 발현 유도 인자를 이용하여 발현을 인위적으로 유도하는 방법이 사용되고 있는데, 여기서는 발현 유도 인자의 단가가 생산성에 영향을 미치게 된다. 아울러, 상기 방법에 의해 유용 효소 또는 단백질이 높은 효율로 발현된다 하더라도 이와 같이 생산된 단백질은 세포 내에서 결정체를 형성하게 되어 이를 용해시키는데 많은 어려움이 따른다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 목적 단백질을 세포 외로 분비시키는 방법이 개발되고 있는데, 이 역시 분비된 많은 효소들이 세포의 성장에 나쁜 영향을 미친다는 문제점이 보고되고 있다.

본 연구에서는 특정 발현 유도 인자가 없이도 유용 효소 또는 단백질을 안정적으로 대량 발현하되 세포의 성장에 영향을 주지 않으면서 발현이 유도되며 생산된 단백질을 효율적으로 회수할 수 있는 발현 시스템을 개발하고자 노력한 결과, *B. thuringiensis* 유래 *cry*1 계열 독소단백질유전자의 포자형성과정에 의존적인 프로모터(SEP 프로모터)를 이용한 발현 시스템을 개발하였고, 상기 발현시스템을 이용하여 내생포자를 형성하는 세균으로부터 목적 단백질의 발현을 조절하여 궁극적으로 대량 생산할 수 있는 시스템을 개발하였다.

본 연구에서 사용한 *B. thuringiensis*균 유래 독소 단백질 프로모터는 독소 단백질 유전자 *cry1Aa* (22), *cry1Ca* (23) 및 *cry1Ka* (24) 유전자의 프로모터 부위를 PCR 방법을 통해 클로닝하여 사용하였다.

가. SEP 프로모터를 이용한 cellulase 고발현 시스템 제작

1) *cry1Aa* 유전자 프로모터를 이용한 cellulase 고발현 플라스미드 제작

재조합 플라스미드 제작을 위한 기본 벡터로 pHPS9 플라스미드(25)를 사용하였는데

이는 본 발명자의 선행연구에 의해 pHPS9 플라스미드가 *B. subtilis* 외에 *B. thuringiensis* 와 *B. cereus* 내에서도 안정하게 유지됨을 확인한데 따른 것이다. 우선 pHPS9 플라스미드의 유용성을 높이기 위해 pUC19 플라스미드의 multiple cloning site를 *Hind*III와 *Eco*RI효소를 이용하여 옮겨 넣음과 동시에 본 발명에 필요치 않은 일부분을 제거함으로써 pHPS19 플라스미드를 제작하였다(Fig. 2). 다음 단계로는 *cry1Ac*유전자를 함유하고 있는 pMK73 플라스미드로부터 PCR에 의해 전사종결구조를 포함하는 DNA 단편을 얻어 pHPS19의 *Eco*RI 위치에 삽입하였다. 이는 후에 목적하는 유전자의 전사 효율을 높이기 위한 것으로 Adang 등 (26)에 의해 이미 그 구조가 잘 알려진 *cry1Ac*유전자의 전사종결구조를 선택한 것이며, PCR을 위한 primer로는

A: 5′ GTGGAATTCCTCCTTATGGAGGAATAG 3′와

B: 5′ GGCGAATTCCCCCTTTTCGAGG 3′를 사용하였다.

이 primers에 의해 생성되는 DNA단편의 크기는 330bp 이며 *Eco*RI 효소로 양 말단을 절단한 후 pHPS19의 *Eco*RI 위치에 삽입하여 pHPS20을 제작하였다(Fig. 3).

cry1Aa 유전자를 함유하는 플라스미드 pES1(22)은 BGSC로부터 분양받아 사용하였으며 (BGSC 균주번호; ECE14), 제한효소 *Hind*III site와 PCR을 이용하여 *cry1Aa* 유전자의 프로모터 부위 및 상위부위를 포함하는 약 3.1kb 크기의 DNA 단편(*Hind*III-*Bam*HI 단편)을 얻은 다음, 이를 앞서 제작한 pHPS20의 *Hind*III-*Bam*HI위치에 삽입함으로써 발현벡터 pCPa4 플라스미드를 제작하였다(Fig. 4). 여기서 3.1kb DNA 단편 한쪽 끝의 *Bam*HI site는 PCR을 이용하여 *cry1Aa* 유전자의 ATG start 코돈 직후에 인위적으로 만들어 넣은 것이다.

다음은 발현벡터 pCPa4에 *B. subtilis* 유래의 cellulase유전자 *celBS*를 연결하는 과정이다. 셀룰라아제 유전자는 선행연구에 의해 pBS1 플라스미드에 클로닝 된 것을 사용하였다(27). 셀룰라아제 유전자 SD시퀀스 상위부위에 *Bam*HI 위치를 만들어 넣고 구조유전자 N-말단부위를 포함하는 DNA 단편을 얻고자 pBS1 플라스미드를 template로 하고, 두 primer

B: 5′ TTTACAATGAGTTCGGATCCATAAGAAGTG 3′,

C: 5′ CGTTTGGCGTGTTTCCGTAAAGGC 3′ 를 이용하여 PCR을 수행하였고 C-말단을 포함하는 나머지 부위를 *Pst*I과 *Eco*RI 효소를 이용하여 pBS1으로부터 확보한 다음 이 두 단편을 pUC19 벡터의 *Bam*HI-*Pst*I 위치에 T4 DNA ligase를 이용하여 결합

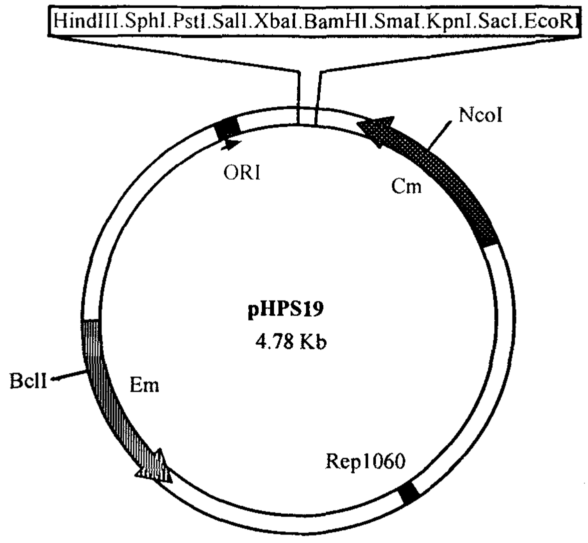


Fig. 2. Restriction map of vector plasmid pHPS19

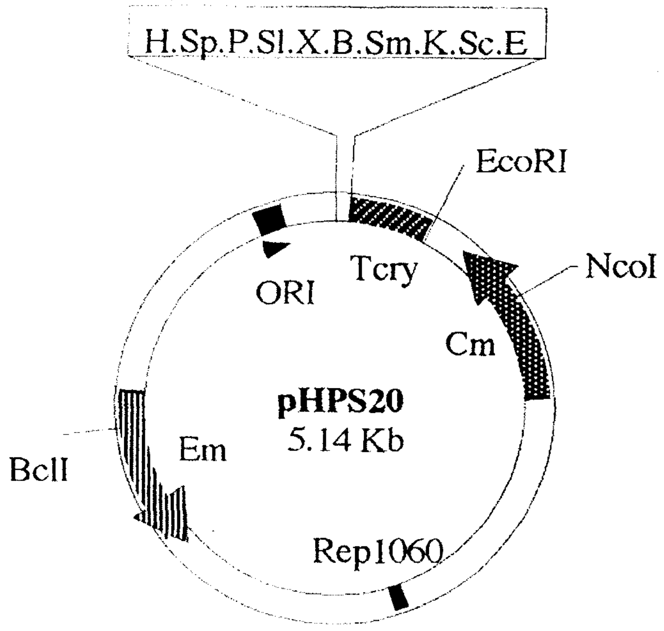


Fig. 3. Restriction map of plasmid pHPS20

시켜 pBS2 플라스미드를 제작하였다(Fig. not shown). pBS2를 *Hind*III로 절단하여 Klenow로 filling하고 다시 *Bam*HI으로 절단하여 셀룰라아제 유전자 *celBS*를 함유하는 1.56kb의 DNA 단편을 분리한 후, 이를 앞서 제작한 pCPa4 발현벡터의 *Bam*HI-*Sma*I 위치에 삽입함으로써 목적하는 셀룰라아제 발현용 플라스미드, pCPaC1을 제작하였다(Fig. 5).

한편 대조구로서 활용하고자 벡터 플라스미드 pHPS19에 자체 프로모터만을 지닌 *celBS* 유전자를 삽입하여 pSPC100 플라스미드를 제작하였다. pBS1을 *Pst*I 제한효소로 절단하여 *celBS*를 포함하는 3.14kb 단편을 분리한 후 이를 pHPS19의 *Pst*I 위치에 삽입하여 pSPC100 플라스미드를 제작하였다(Fig. 6).

2) *cry1Aa* 유전자 프로모터 상위부위 크기 조절 및 cellulase signal sequence 변이체 제작

cry1Aa 프로모터 상위부위의 크기가 셀룰라아제의 발현에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위한 목적으로 Fig. 7 에 나타낸 바와 같이 상위부위의 크기를 제한효소 *Acc*I과 *Hpa*I을 이용하여 각각 0.5kb와 0.15kb(ATG start codon을 기점으로 함)로 줄인 pCPaC2와 pCPaC3를 제작하였다. 한편 pCPaC3로부터 PCR을 이용하여 셀룰라아제 유전자의 자체 SD sequence가 제거되고 signal sequence 일부, 즉 아미노산서열 2개가 변이된 플라스미드 pCPaC3ds와 signal sequence 대부분이 제거된 플라스미드 pCPaC3xs를 제작하였다. 이들을 제작한 목적은 셀룰라아제의 발현에 signal sequence가 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위한 것이다. pCPaC3ds 제작을 위해서는

primer D: 5′ GATCAGATATGGATCCGTCAATCTCTA 3′와

primer E: 5′ CGTTTGGCGTGTTTCCGTAAAGGC 3′를 사용하였고

pCPaC3xs 제작을 위해서는

primer F: 5′ TTCGCCGGATCCAGCAGCAGGGACAAAAAC 3′와

primer E를 사용하였다. 이들 primers와 template DNA pBS1을 이용하여 얻은 PCR 산물들의 양 말단을 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI로 절단한 다음, 그 결과물로서 얻은 o.44kb DNA 단편과 0.36kb DNA 단편을 각각 pCPaC3의 *Bam*HI-*Eco*RI 부위(0.49kb)에 대체시키는 방법으로 pCPaC3ds와 pCPaC3xs를 제작하였다. pCPaC2의 주요 발현시스템 부위와 pCPaC3, pCPaC3ds, 및 pCPaC3xs의 프로모터-signal sequence 부위의 염기서열

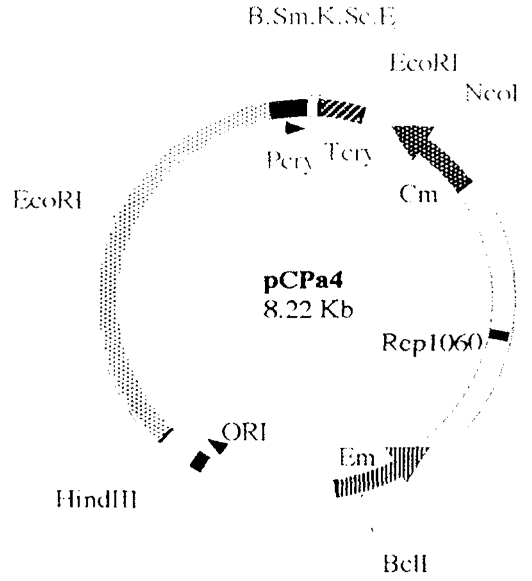


Fig. 4. Restriction map of plasmid pCPa4

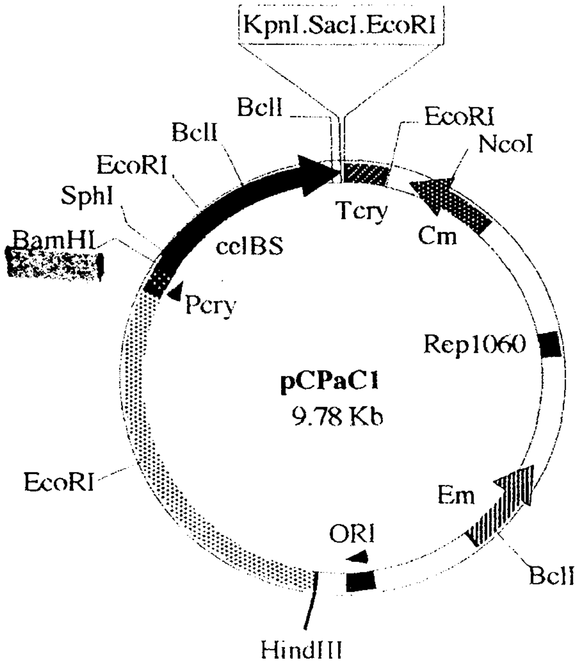


Fig. 5. Restriction map of plasmid pCPaC1

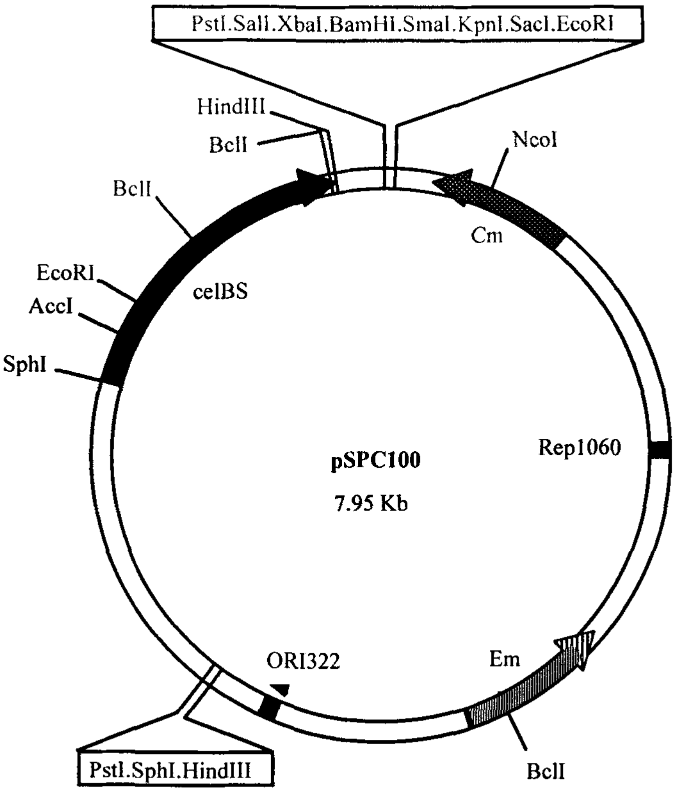


Fig. 6. Restriction map of the plasmid pSPC100

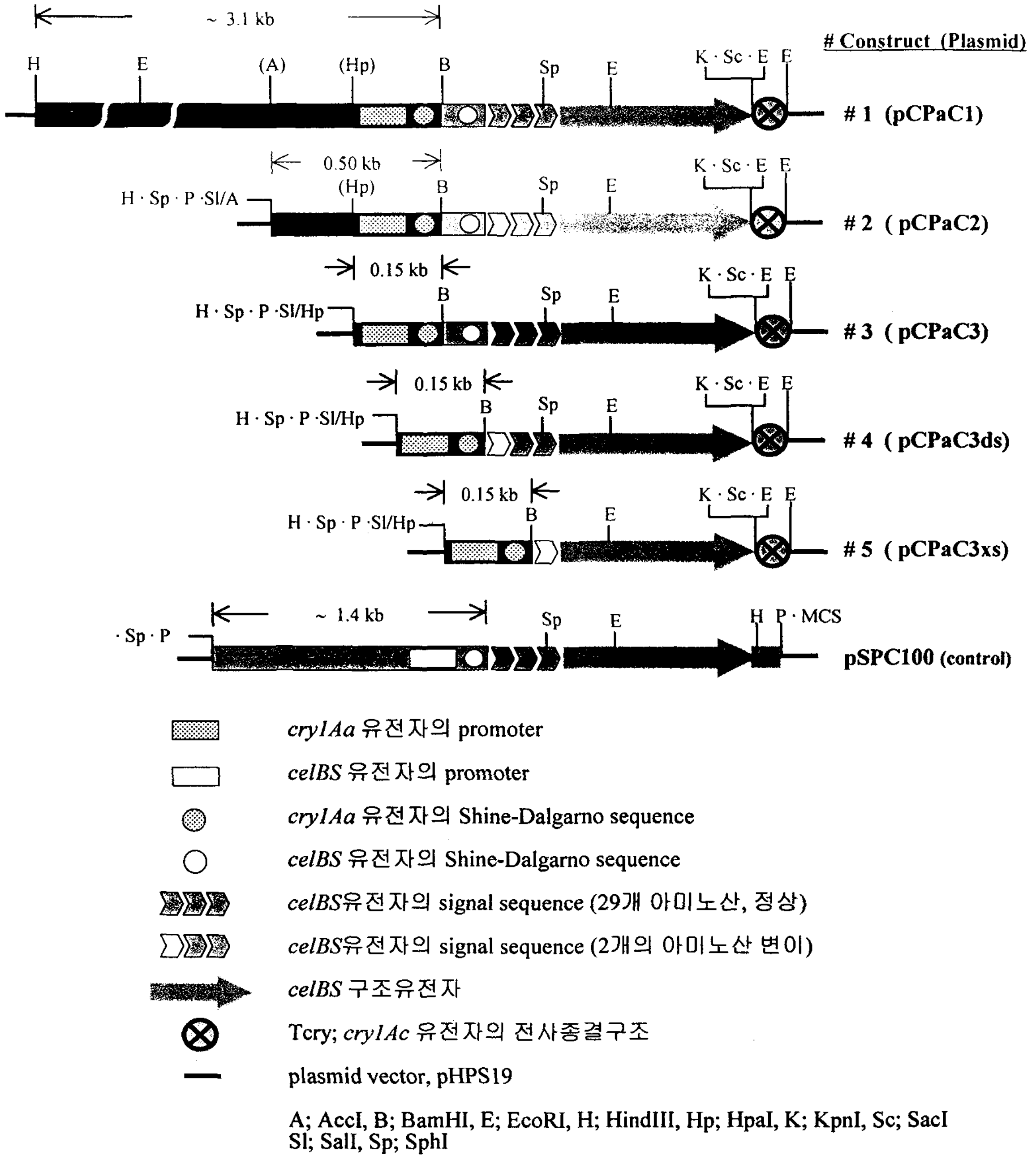


Fig. 7. *cry1Aa* 유전자 프로모터 상위부위 크기 조절 및 cellulase signal sequence 변이체 마련을 위해 pCPaC1을 모체로 제작된 plasmids의 발현 관련 주요부위

과 관련 정보를 Fig. 8 ~ Fig. 11 에 나타내었다.

3) *cry1Ka* 와 *cry1Ca* 유전자 프로모터를 이용한 cellulase 고발현시스템 제작

PCR에 의하여 두 유전자 *cry1Ka* 와 *cry1Ca*의 프로모터 부위를 확보하였는데 PCR 산물의 양 말단에 *Hind*III와 *Bam*HI site가 오도록 하였고 결과물로서 얻은 0.30kb DNA 단편과 0.24kb DNA 단편을 각각 pCPaC3의 *Hind*III-*Bam*HI 위치에 대체시킴으로써 pCPkC4와 pCPcC5를 제작하였다. pCPkC4와 pCPcC5 플라스미드의 셀룰라아제 유전자 발현과 관련된 주요 부위의 개략도를 Fig. 12 에 나타내었다.

나. SEP 프로모터 및 전사종결구조를 이용한 xylanase 고발현시스템 제작

B. subtilis 168 균주로부터 xylanase 유전자를 클로닝하기 위하여 PCR을 수행하였다. Wolf 등(28)이 보고한 xylanase 유전자의 염기서열을 참고하여 primers N과 O를 디자인하였고 *B. subtilis* 168 균주로부터 분리한 염색체 DNA를 template로 하였다.

primer N: 5′GCTACCTCAAAGTCGGATCCAATATTATAG 3′와

primer O: 5′CTGATTAAGGATGAGCTCTTACCACACTGT를 사용하였다. PCR에 의해 얻은 DNA 단편은 xylanase 유전자의 SD sequence 부위, signal sequence 및 구조유전자를 포함하는데 양말단을 *Bam*HI과 *Sac*I으로 절단한 후의 크기가 0.67kb이다. 이 DNA 단편을 pCPaC3의 *Bam*HI-*Sac*I 위치에 대체시킴으로써 pCPaX1을 제작하였다. pCPaX1 플라스미드의 xylanase 유전자 발현과 관련된 주요 부위의 개략도를 Fig. 13 에 나타내었다.

다. SEP 프로모터 및 전사종결구조를 이용한 α-amylase 고발현시스템 제작

B. subtilis 168 균주로부터 α-amylase 유전자 *amyE* 를 클로닝하기 위하여 PCR을 수행하였다. Yang 등(29)이 보고한 α-amylase 유전자의 염기서열을 참고하여 primers P와 Q를 디자인하였고 *B. subtilis* 168 균주로부터 분리한 염색체 DNA를 template로 하였다.

primer P: 5′GTAAGAGGGATTTTTGGATCCGAAGTAAGT 3′와

primer Q: 5′GTCTAGCCGAGCTCTCAATGGGGAAGAGA를 사용하였다. PCR에 의해 얻은 DNA 단편은 α-amylase 유전자 *amyE* 의 SD sequence 부위, signal

```
    HincII/AccI
GCAGGTCAGACAAACGAGTAATATTGGTAAATTAGTGGTTGTAGATACAAACGAATTATG 60

GGTCTATGGTTCTGCTAATTGGAATGATAAGATTAAGACTGTAAAAAAAGGGGAAGCATT 120

TACAATTCAAGATGAATTGCAGGTAAATGGTTCTAACATGTATAAGTGTAAGTATTTCTA 180

CATTACCGCAAATTCTCAATTTGTATATGTAAAATAGGAAAAGTGGATTTTATATATAAG 240

TATAAAAAGTAATAAGACTTTAAAATAAGTTAACGGAATACAAACCCTTAATGCATTGGT 300

TAAACATTGTAAAGTCTAAAGCATGGATAATGGGCGAGAAGTAAGTAGATTGTTAACACC 360

CTGGGTCAAAAATTGATATTTAGTAAAATTAGTTGCACTTTGTGCATTTTTTCATAAGAT 420
                                             -35
GAGTCATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAAACAGTATTATATCATAATGAATTGGTAT 480
   -10
                              BamHI
CTTAATAAAAGAGATGGAGGTAACTTATGGATCCATAAGAAGTGTAGAGCCAAAATGATG 540
                SD(cry1Aa)
                         -> CelBS signal sequence
CGAAGGAGGAAAAGATCAGATATGAAACGGTCAATCTCTATTTTTATTACGTGTTTATTG 600
  SD(celBS)              M  K  R  S  I  S  I  F  I  T  C  L  L
                                                  -> CelBS mature sequ
ATTACGTTATTGACAATGGGCGGCATGCTGGCTTCGCCGGCATCAGCAGCAGGGACAAAA 660
 I  T  L  L  T  M  G  G  M  L  A  S  P  A  S  A  A  G  T  K

ACGCCAGTAGCCAAGAATGGCCAGCTTAGCATAAAAGGTACACAGCTCGTTAACCGAGAC 720
 T  P  V  A  K  N  G  Q  L  S  I  K  G  T  Q  L  V  N  R  D

GGTAAAGCGGTACAGCTGAAGGGGATCAGTTCACACGGATTGCAATGGTATGGAGAATAT 780
 G  K  A  V  Q  L  K  G  I  S  S  H  G  L  Q  W  Y  G  E  Y

GTCAATAAAGACAGCTTAAAATGGCTGAGGGACGATTGGGGTATCACCGTTTTCCGTGCA 840
 V  N  K  D  S  L  K  W  L  R  D  D  W  G  I  T  V  F  R  A

GCGATGTATACGGCAGATGGCGGTATAATTGACAACCCGTCCGTGAAAAATAAAATGAAA 900
 A  M  Y  T  A  D  G  G  I  I  D  N  P  S  V  K  N  K  M  K

GAAGCGGTTGAAGCGGCAAAAGAGCTTGGGATATATGTCATCATTGACTGGCATATCTTA 960
 E  A  V  E  A  A  K  E  L  G  I  Y  V  I  I  D  W  H  I  L
```

Fig. 8. Plasmid pCPaC2의 cellulase (*celBS*) 발현관련 주요 부위의 염기서열 및 관련 정보

```
HincII/HpaI
AGGTCAACACCCTGGGTCAAAAATTGATATTTAGTAAAATTAGTTGCACTTTGTGCATTT    60
                                                       -35

TTTCATAAGATGAGTCATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAAACAGTATTATATCATAA   120
                 -10
                                        BamHI
TGAATTGGTATCTTAATAAAAGAGATGGAGGTAACTTATGGATCCATAAGAAGTGTAGAG   180
                          SD(cry1Aa)
                                 ┌▶ CelBS signal sequence
CCAAAATGATGCGAAGGAGGAAAAGATCAGATATGAAACGGTCAATCTCTATTTTTATTA   240
              SD(celBS)            M  K  R  S  I  S  I  F  I  ┌▶ CelBS mature sequence

CGTGTTTATTGATTACGTTATTGACAATGGGCGGCATGCTGGCTTCGCCGGCATCAGCAG   300
T  C  L  L  I  T  L  L  T  M  G  G  M  L  A  S  P  A  S  A

CAGGG...                                                       305
A  G . . .
```

Fig. 9. Plasmid pCPaC3의 *celBS* 발현관련 주요 부위의 염기서열 및 관련 정보

```
AGGTCAACACCCTGGGTCAAAAATTGATATTTAGTAAAATTAGTTGCACTTTGTGCATTT    60

TTTCATAAGATGAGTCATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAAACAGTATTATATCATAA   120

TGAATTGGTATCTTAATAAAAGAGATGGAGGTAACTTATGGATCCGTCAATCTCTATTTT   180
                                       M  D  P  S  I  S  I  F

TATTACGTGTTTATTGATTACGTTATTGACAATGGGCGGCATGCTGGCTTCGCCGGCATC   240
 I  T  C  L  L  I  T  L  L  T  M  G  G  M  L  A  S  P  A  S

AGCAGCAGGG...                                                  250
 A  A  G . . .
```

Fig. 10. Plasmid pCPaC3ds의 *celBS* 발현관련 주요 부위의 염기서열 및 관련 정보

```
  HincII/HpaI
AGGTCAACACCCTGGGTCAAAAATTGATATTTAGTAAAATTAGTTGCACTTTGTGCATTT     60
                                                      -35

TTTCATAAGATGAGTCATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAAACAGTATTATATCATAA    120
                -10                    ┌─▶CelBS start codon
                                       │            ┌─▶CelBS mature sequence
                                       │  BamHI     │
TGAATTGGTATCTTAATAAAAGAGATGGAGGTAACTTATGGATCCAGCAGCAGGG...     175
                          SD(cry1Aa)    M  D  P  A  A  G . . .
```

Fig. 11. Plasmid pCPaC3xs의 *celBS* 발현관련 주요 부위의 염기서열 및 관련 정보

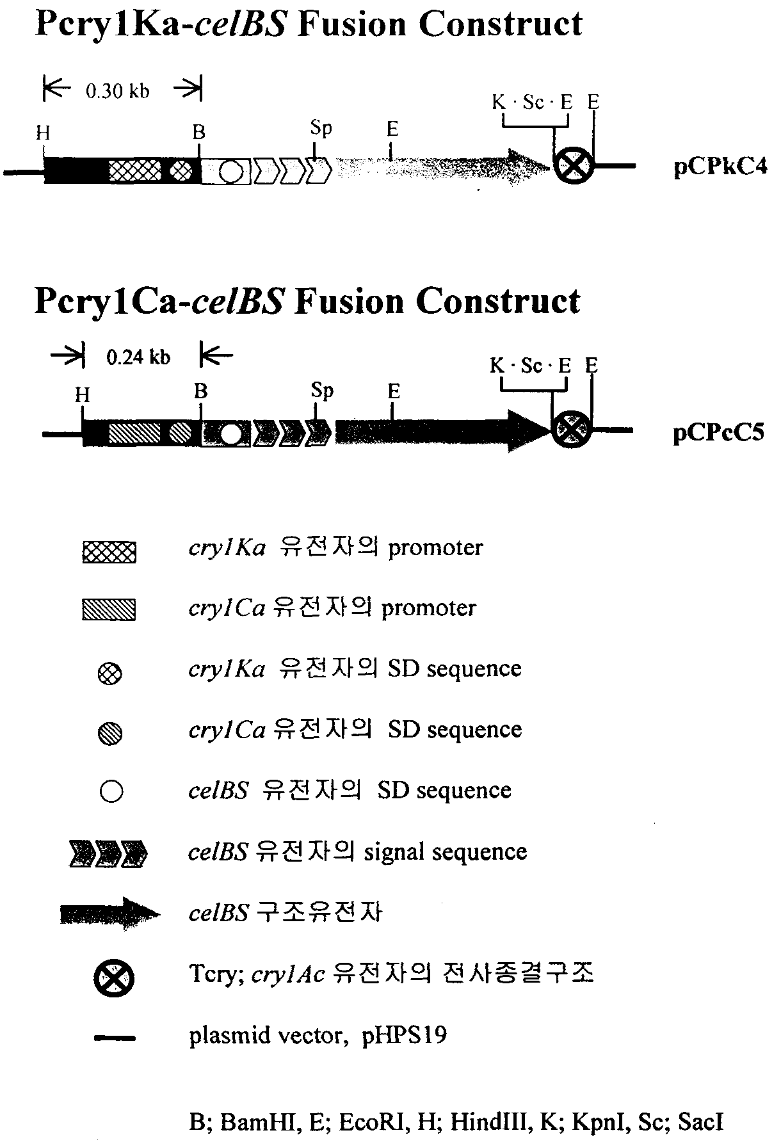
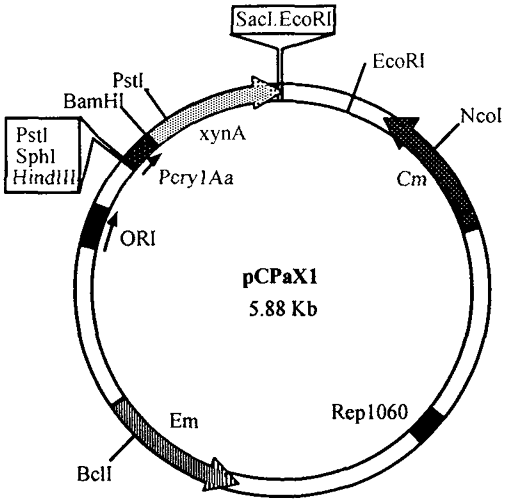


Fig. 12. Plasmid pCPkC4와 pCPcC5의 *celBS* 유전자 발현과 관련된 주요 부위의 개략도

(A)



(B)

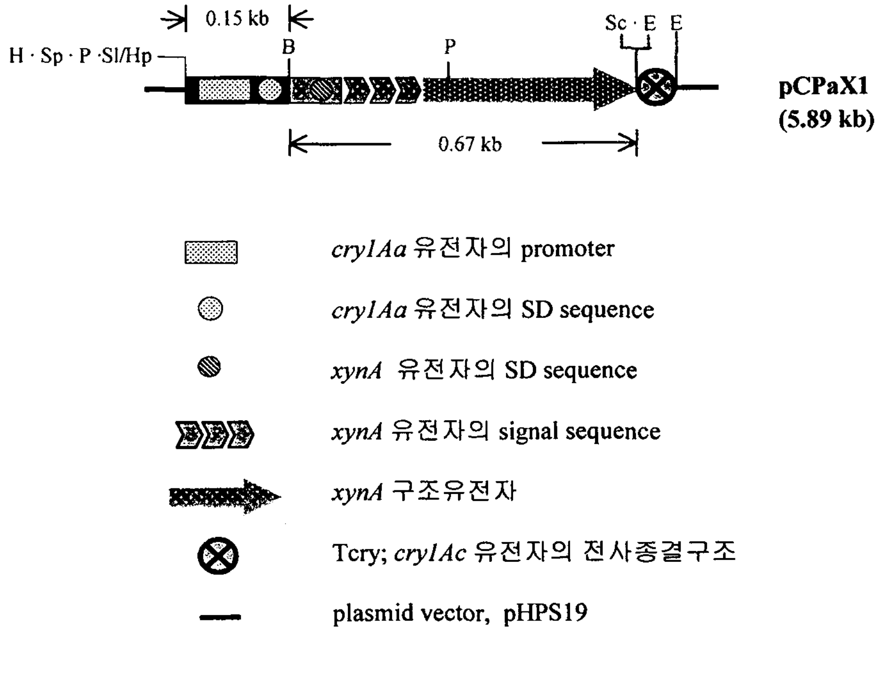


Fig. 13. Plasmid pCPaX1의 제한효소지도(A) 및 xylanase (*xynA*) 발현 관련 주요 부위의 개략도(B)

sequence 및 구조유전자를 포함하는데 양말단을 *Bam*HI과 *Sac*I으로 절단한 후 이 DNA 단편을 pCPaC3의 *Bam*HI-*Sac*I 위치에 대체시킴으로써 pCPaA1을 제작하였다. pCPaA1 플라스미드의 α-amylase 유전자(*amyE*) 발현과 관련된 주요 부위의 개략도를 Fig. 14에 나타내었다.

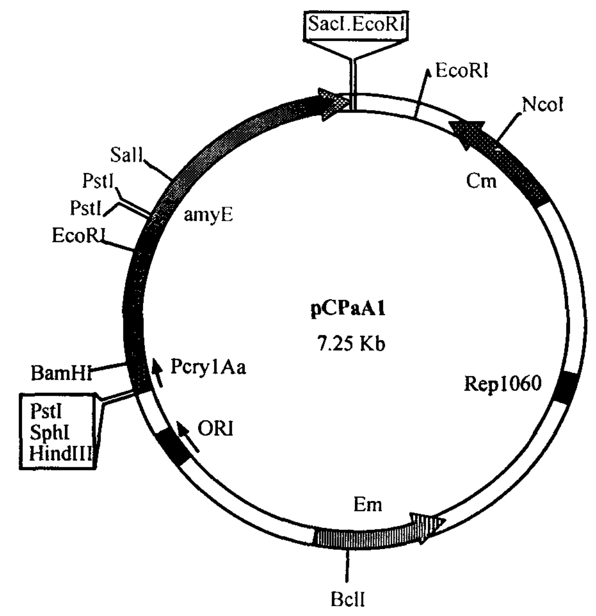
라. SEP 프로모터를 이용한 셀룰라아제 생산성 조사

재조합 *Bacillus* 균의 배양 및 효소의 역가측정은 다음과 같이 하였다. 재조합 *Bacillus* 균을 적절한 항생제가 들어있는 LB agar 배지에 접종하고 30℃ 또는 37℃에서 15시간 정도 배양하여 신선한 콜로니를 형성하게 하였다. 종배양액을 준비하기 위해 신선한 콜로니 1개를 백금니로 취해 항생제가 적정농도로 첨가된 LB 배지 2ml (스테인레스 캡이 장착된 25ml 시험관)에 접종하였다. 30℃에서 10-12 시간 진탕배양한 후 항생제가 적절히 첨가된 본 배양 배지 (HCO 배지 또는 2x DSM 배지) 30ml(1L 삼각플라스크)에 2% 접종하였다. 30℃ 또는 37℃에서 250rpm으로 진탕배양 하면서 적당한 시간 간격으로 샘플을 채취하여 성장(OD600)을 측정하고 효소 역가를 측정하였다. 필요시 배양 상등액과 세포추출물의 역가를 따로 측정하였다. 세포추출물을 얻기 위해서는 원심분리하여 회수한 cell pellet을 완충용액(0.05M, K-phosphate, pH6.5)으로 1회 세척 후 동량의 완충용액에 현탁하여 초음파 분쇄하였으며, 이를 다시 원심분리하여 그 상등액을 시료로 사용하였다.

cry1Aa promoter에 의해 외래의 셀룰라아제 유전자가 어느 수준으로 발현되는지 알아보기 위하여, 또한 이때 *cry1Aa* promoter의 상위부위 및 셀룰라아제의 signal sequence 가 발현에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위하여 Fig. 7 에 나타나 있는 6종의 플라스미드, pCPaC1, pCPaC2, pCPaC3, pCPaC3ds, pCPaC3xs, 및 대조구로서 pSPC100을 각각 함유하는 *B.t.* 4D11균의 형질전환체들을 클로람페니콜을 5μg/ml 되도록 첨가한 HCO 배지에 배양하면서 20, 24, 41및 48시간 배양 샘플을 취하여 배양상등액과 세포추출액의 셀룰라아제 역가를 측정하였고 이를 합산하여 배양액 ml당 역가를 Fig. 15에 나타내었다. pCPaC1의 경우 대조구로 사용한 pSPC100(셀룰라아제 자체의 프로모터에 의해 발현되는 시스템)에 비하여 40-50배 정도의 높은 생산성을 나타내었다. 이 결과는 *B. subtilis* 모균의 생산성(약 0.2 units/ml)에 비해서는 100배 이상 되는 수치이다.

한편 *cry1Aa* promoter의 상위부위를 크기를 pCPaC1의 경우 약 3.1kb (ATG 스타트

(A)



(B)

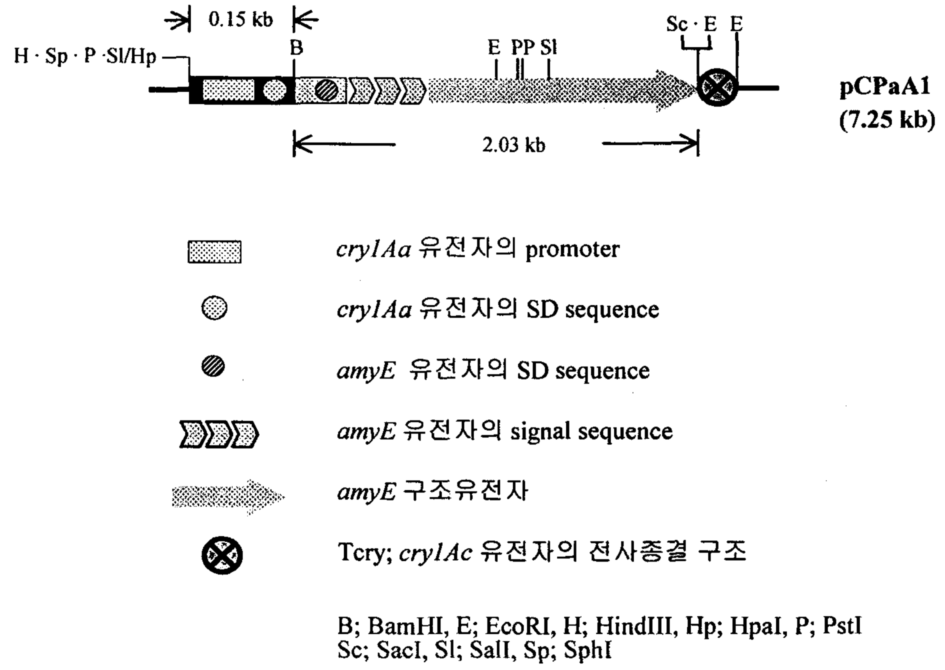


Fig. 14. Plasmid pCPaA1의 제한효소지도(A) 및 α-amylase (amyE) 발현관련 주요 부위의 개략도(B)

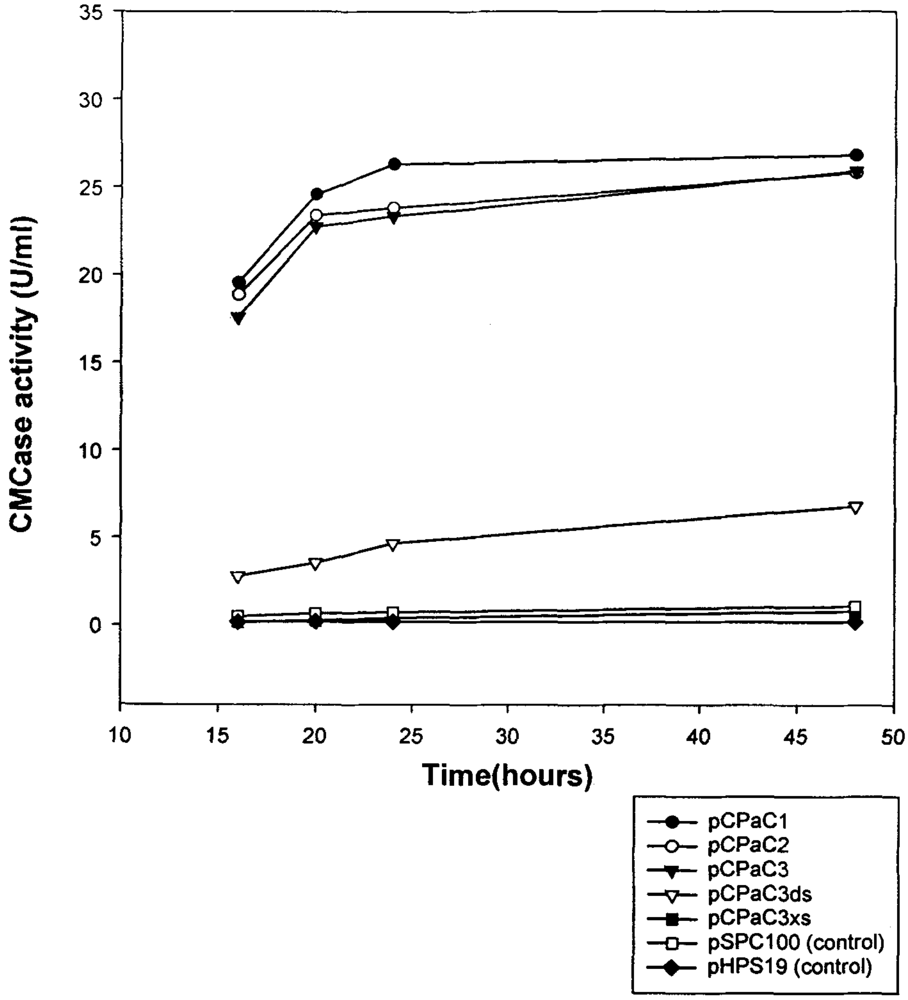


Fig. 15. pCPaC1 plasmid 및 이의 유도체들을 각각 함유하는 *B.t.* 4D11균 형질전환체들의 배양시간에 따른 CMCase역가

코돈을 기점으로 함)에서 pCPaC2와 pCPaC3의 경우 각각 0.50kb 및 0.15kb로 줄였을 경우에도 발현수준이 대등한 것으로 보아 0.15kb 이상의 상위부위가 외래 효소유전자 발현에 있어서는 중요치 않음을 알 수 있었다.

다른 한편 셀룰라아제 segnal sequence중 두 번째와 세 번째 아미노산이 변이된 (Lys-> Asp, Arg->Pro) pCPaC3ds의 경우 발현수준이 1/5 수준 이하로 감소되고, segnal sequence 대부분이 제거된 pCPaC3xs의 경우 발현수준이 1/20 수준 이하로 크게 떨어지는 것을 볼 때 *cry* promoter에 의해 포자형성기에 외래효소를 고발현시키는 과정에 있어서 생산된 효소를 세포 밖으로 원활히 분비시키는 것이 중요함을 알 수 있었다. 참고로 pCPaC3의 경우 배양액 중에 들어있는 셀룰라아제 역가 비율이 20시간 배양의 경우 전체 역가의 60-80%였고 pCPaC3ds의 경우 5% 이하인 것으로 분석되었다.

마. 3종의 SEP 프로모터에 의한 배양시간별 cellulase 발현 조사

다양한 *cry* 유전자의 프로모터들을 외래 효소유전자의 고발현에 보편적으로 이용할 수 있는지 살펴보고자 *cry1Ka* 와 *cry1Ca* 유전자의 프로모터를 이용한 셀룰라아제 발현 시스템을 앞서 기술한 바와 같이 제작하였다. 그 결과로 얻은 pCPkC4와 pCPcC5 플라스미드를 *B.t.* 4D11숙주균에 도입한 후 *cry1Aa* 프로모터를 이용하여 제작한 pCPaC3의 경우와 셀룰라아제 생산성을 비교하였다. 이때 pHPS19과 pSPC100 플라스미드를 각각 함유하는 재조합 4D11균주를 대조구로서 사용하였다. 이들 재조합 *B. t.*균주들의 배양시간에 따른 셀룰라아제 발현양상을 함께 살펴보고자 클로람페니콜을 5㎍/ml 되도록 첨가한 HCO 배지에 배양하면서 일정시간 간격으로 샘플을 취하여 역가를 측정하였다. 현미경 관찰 결과 배양 13-14시간 후부터 포자가 관찰되기 시작하였고 18시간 후에는 70-80% 이상의 포자형성률을 보였으며, 대개 24시간이 경과하면서부터 세포가 lysis되어 포자가 노출되는 것으로 나타났다.

3-6시간 간격으로 채취한 배양액 시료를 그대로 초음파처리하여 세포를 파쇄한 다음 원심분리하여 그 상등액을 얻어 셀룰라아제 역가를 측정한 결과 Fig. 16 에 나타난 바와 같이 세 가지 프로모터를 이용한 발현시스템 모두 대등하게 높은 수준의 생산성을 나타내었다. 이 세 가지 프로모터에 의한 발현시스템을 지니는 재조합균주들은 두 가지의 대조구, pHPS19과 pSPC100 경우에 비해 각각 약 100배 및 50배 높은 생산성을 나타내었다.

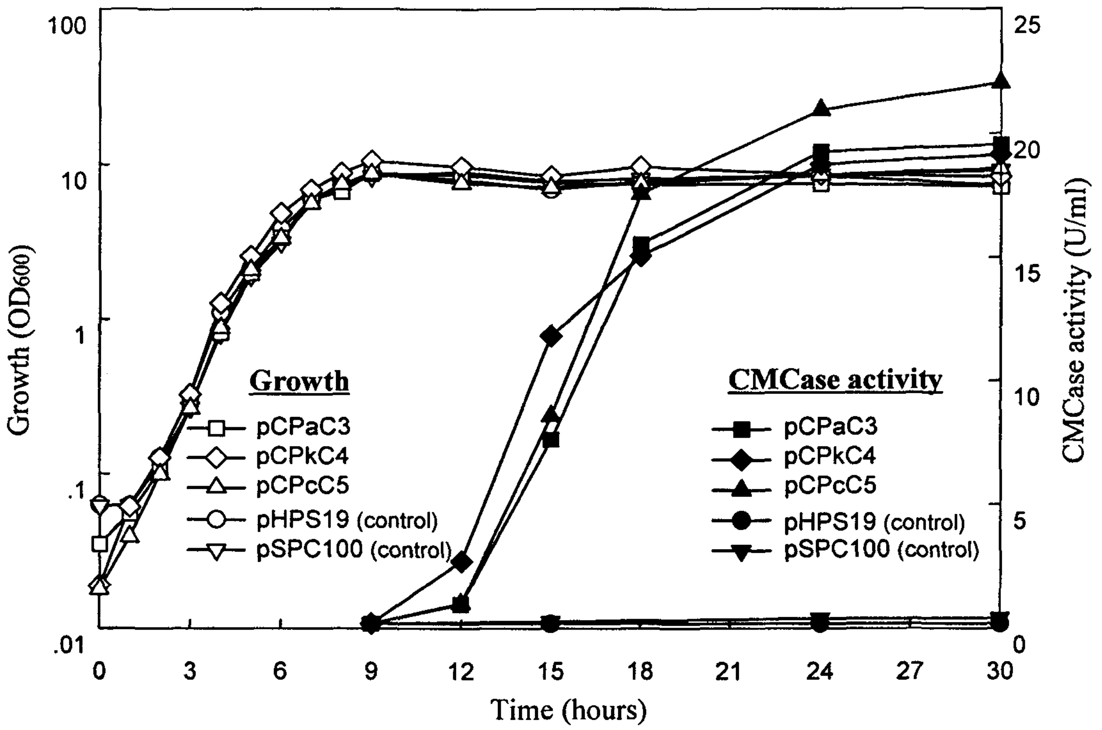


Fig. 16. pCPaC3, pCPkC4, pCPcC5 및 대조구로서의 두가지 plasmid, pHPS19 및 pSCP100을 각각 함유하는 *B.t.* 4D11균 형질전환체들의 성장곡선 및 배양시간에 따른 CMCase역가

한편 이들 세가지 *cry*프로모터에 의한 발현은 *B. t.* 독소단백질생산의 경우와 마찬가지로 포자형성과정과 밀접하게 연계되어 이루어짐을 확인하였다. 즉 *B. t.* 균이 대수증식기를 지나 포자형성기로 진입하는 시기부터 발현되기 시작하여 포자형성이 진행되는 동안 셀룰라아제 생산이 이루어졌다. 이와 함께 Fig. 16 에 나타난 바와 같이 본 연구의 발현시스템에 의한 셀룰라아제의 고발현이 숙주균의 성장에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었고 이점이 본 연구의 발현시스템의 장점중 하나이다. 이상의 연구결과로부터 *cry1Aa, cry1Ka* 및 *cry1Ca* 유전자 프로모터 외에 포자형성기에 발현을 지시하는 다양한 종류의 *cry*프로모터들을 효소유전자 발현에 이용할 수 있음을 알 수 있었다.

또한 76시간까지 배양시간을 연장할 경우에도 셀룰라아제 역가가 안정되게 유지되는 것으로 보아 (data not shown) 셀룰라아제가 단백질분해효소에 대하여 안정한 것으로 판단된다.

바. SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의한 배양액중의 cellulase 단백질 분석

(5)항에서 얻은 배양액 시료에 들어있는 전체 단백질 중 셀룰라아제가 차지하는 비율이 어느 정도 되는지 알아보고자 각 형질전환주의 30시간 배양액 시료에 들어있는 전체 단백질을 Trichloroacetic acid(100%)를 이용하여 침전시켜 회수한 후, 적당량의 sample loading buffer를 가하고 가열하여 시료를 제조한 다음, 통상의 방법으로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다.

Fig 17 에 나타난 바와 같이 대조구(pHPS19 또는 pSPC100을 함유하는 4D11 형질전환주)의 경우 셀룰라아제 단백질 밴드가 거의 보이지 않는 반면 *cry* 프로모터 발현시스템을 이용하는 세 가지 형질전환주의 경우 매우 두터운 밴드를 보여주고 있고 배양액중 존재하는 단백질의 대부분을 셀룰라아제가 차지하고 있음을 알 수 있다.

배양시간에 따른 셀룰라아제 생산을 살펴보고자, 또한 생산된 셀룰라아제가 배양액내에서 안정하게 유지되는지 알아보고자 pCPcC5를 함유하는 형질전환주를 택하여 성장단계별 배양액을 같은 방법으로 전기영동하여 살펴본 결과 Fig. 18 에 나타난 바와 같이 배양 15시간부터 셀룰라아제 밴드가 나타나고 24시간 이후에는 큰 변화가 없으며 72시간이 경과하여도 분해되는 현상 없이 안정되게 유지됨을 알 수 있었다.

사. SEP 프로모터를 이용한 xylanase 및 α-amylase 생산

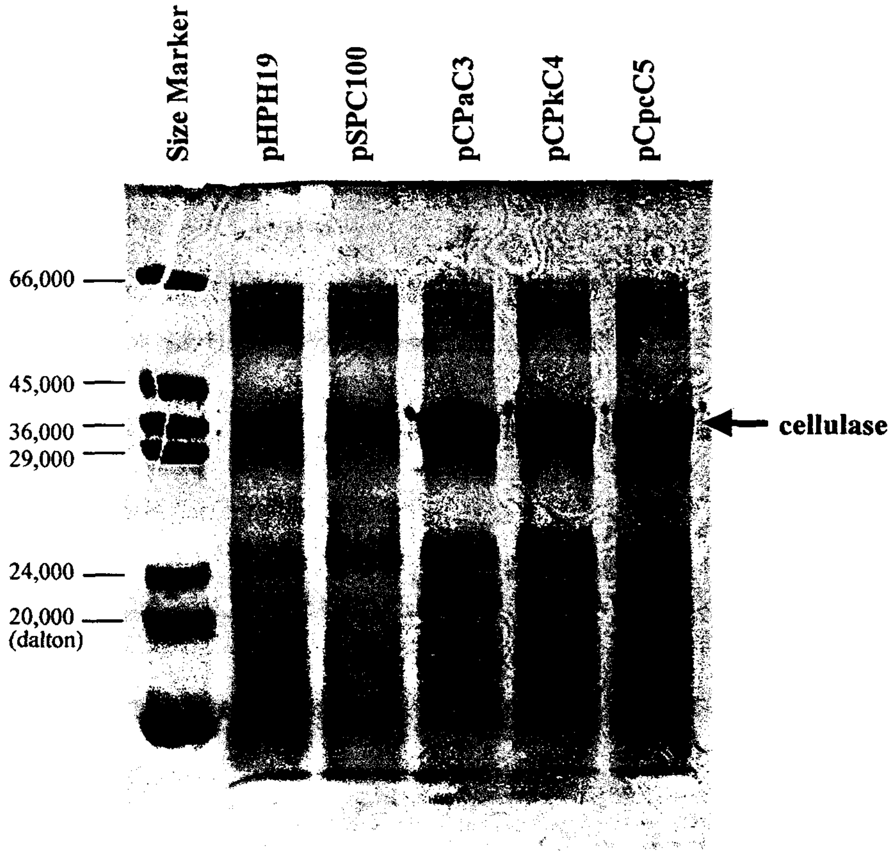


Fig. 17. SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의한 pCPaC3, pCPkC4, pCPcC5 및 대조구로서의 두가지 plasmid, pHPS19 및 pSCP100을 각각 함유하는 *B.t.* 4D11균 형질전환체들의 배양액중의 cellulase 단백질 분석

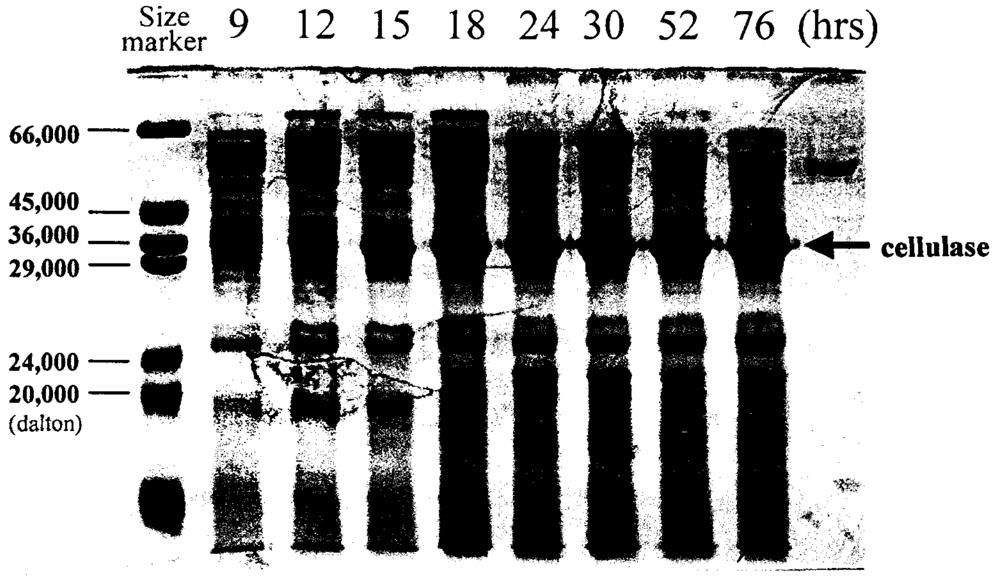


Fig. 18. pCPcC5를 함유하는 *B.t.* 4D11균 형질전환체의 배양시간별 cellulase 단백질 분석

cry1Aa 유전자 프로모터를 이용한 xylanase 및 α-amylase(*amyE*) 발현시스템을 앞서 기술한 바와 같이 제작하였다. xylanase 발현시스템을 지닌 재조합 플라스미드 pCPaX1(Fig. 13)과 α-amylase 발현시스템을 지닌 재조합 플라스미드 pCPaA1(Fig. 14)을 *B.t.* 4D11숙주균에 각각 도입하여 형질전환체들을 얻었고 이들을 각각 클로람페니콜을 5㎍/ml 되도록 첨가한 HCO 배지에 배양하면서 16-48시간 배양시간 중 4회 배양액을 취하여 배양상등액과 세포추출액의 효소역가를 측정하였고, 배양액 ml당 역가를 산정하여 Fig. 19 및 Fig. 20에 나타내었다. xylanase와 α-amylase 역시 cellulase의 경우와 마찬가지로 *cry* 프로모터에 의해 높은 수준으로 발현됨을 확인하였으며 현미경관찰을 통하여 포자형성기에 발현이 일어남을 확인하였다. 두 경우 모두 90% 이상의 역가가 배양상등액에 존재하는 것으로 분석되었으며 따라서 생산된 효소의 대부분이 세포 외로 분비되는 것을 알 수 있었다. 본 결과를 통하여 *cry* 유전자의 프로모터를 이용한 발현시스템을 다양한 외래 효소유전자의 고발현에 보편적으로 이용할 수 있음을 확인하였다.

아. 4종의 *Bacillus* 숙주에서의 SEP 프로모터에 의한 효소 생산성 비교

cry 유전자 프로모터를 이용한 효소발현시스템의 숙주로서 *B. t.* 4D11균 외에 다른 *Bacillus* 균의 이용가능성을 살펴보고자 *B. subtilis* 168, *B. t.* 4Q7 및 *B. cereus* GP7균에 pCPaC3, pCPaX1 및 pCPaA1플라스미드를 각각 도입하여 형질전환주를 얻은 후 *B. t.* 균과 *B. cereus* 균의 경우 클로람페니콜을 5㎍/ml 되도록 첨가한 HCO 배지에, *B. subtilis* 균의 경우 2SG 배지에 24시간 배양하여 배양액중의 효소역가를 분석한 결과 Table 4 에 나타난 바와 같이 *B. t.* 4D11균 외에 다른 *Bacillus*균에서도 *cry* 유전자 프로모터에 의한 효소생산이 벡터 플라스미드만 도입시킨 대조구에 비해 10내지 100배 이상 높은 수준으로 이루어짐을 확인하였다. 따라서 본 연구의 발현시스템은 내생포자를 형성하는 다양한 *Bacillus*속 균을 숙주로 이용할 수 있고, 다양한 외래 효소, 특히 고발현시 *Bacillus* 숙주균의 성장을 저해하는 효소의 생산목적에 유용한 것으로 판단된다.

자. *B. subtilis* 168 숙주균에서 SEP 프로모터에 의한 셀룰라아제 발현 조사

B. subtilis 168 숙주균에서 *cry* promoter에 의해 셀룰라아제 유전자 *celBS*가 발현되는 양상을 살펴보기 위하여 플라스미드 pCPaC3와 pHPS19(대조구)을 각각 도입시켜 얻은 형질전환체를 2SG 배지에 배양하면서 적정 시간별로 샘플을 취하여 광학현미경으

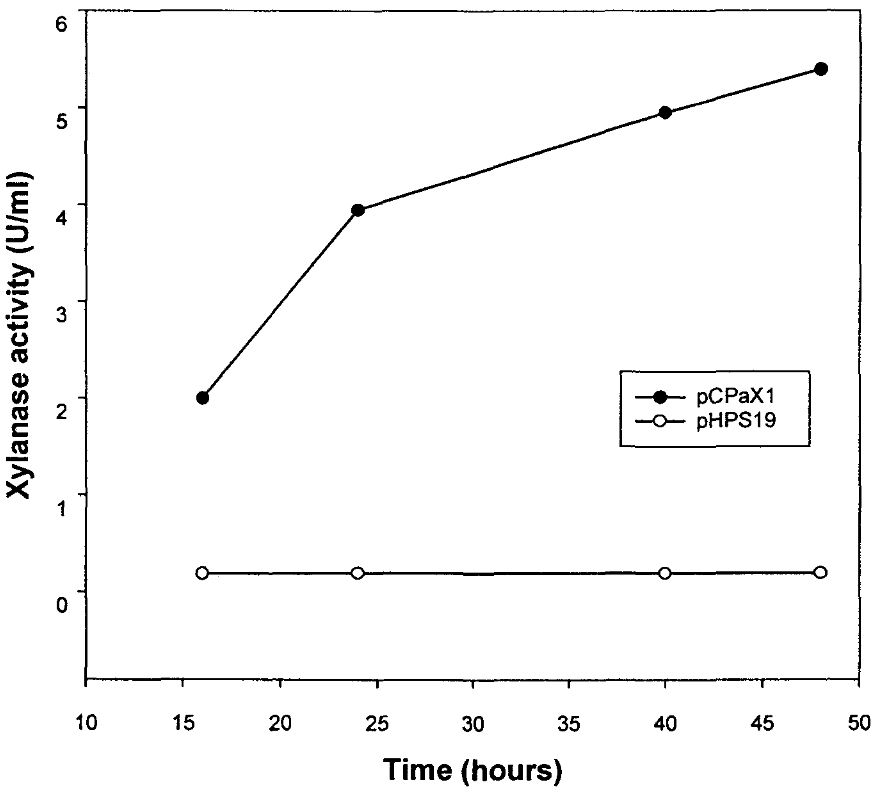


Fig. 19. pCPaX1 plasmid 및 대조구로서 pHPS19을 각각 함유하는 *B.t.* 4D11균 형질전환체들의 배양시간에 따른 xylanase역가

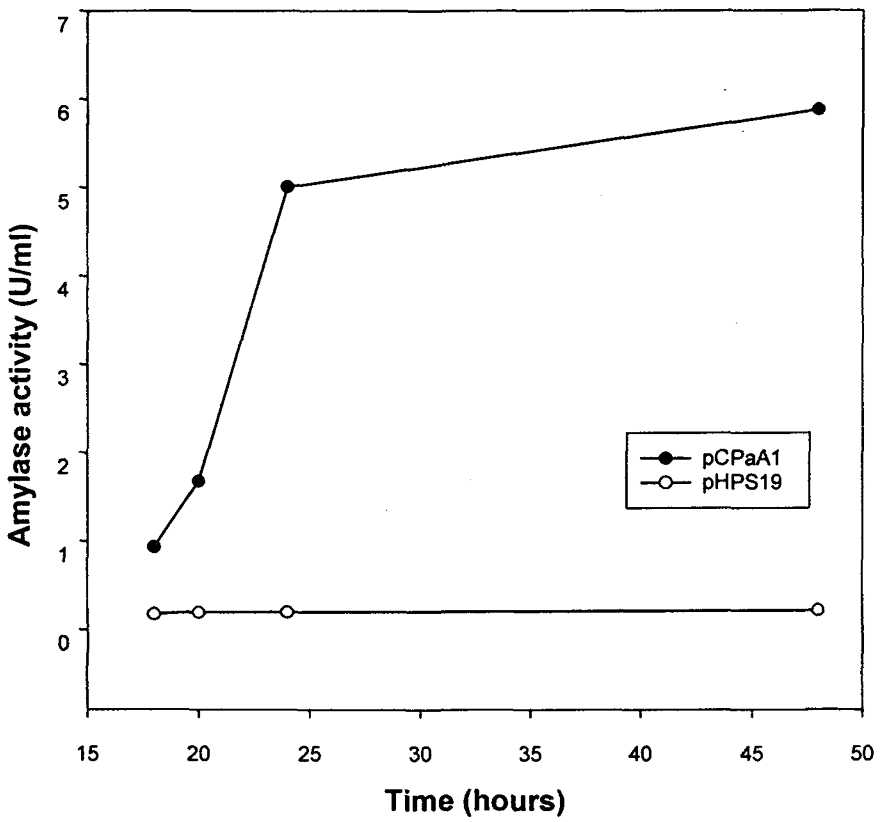


Fig. 20. pCPaA1 plasmid 및 대조구로서 pHPS19을 각각 함유하는 *B.t.* 4D11균 형질전환체들의 배양시간에 따른 α-amylase 역가

Table 4. 4종의 *Bacillus*숙주에서 SEP프로모터 발현시스템에 의한 효소생산성 비교

구분		효소활성 (U/ml)			
효소 · 플라스미드 \ 숙주균		*B.t.* 4D11	*B.t.* 4Q7	*B. cereus* 6E1	*B. subtilis* 168
cellulase (CelBS)	pCPaC3	21.87	16.53	3.21	14.55
	pHPS19 (control)	0.18	0.13	0.19	0.20
xylanase (XynA)	pCPaX1	4.92	2.46	4.47	4.39
	pHPS19 (control)	0.20	0.18	0.23	0.40
α-amylase (AmyE)	pCPaA1	5.88	10.92	15.84	27.67
	pHPS19 (control)	0.22	0.22	0.24	0.70

B.t. 4D11, *B.t.* 4Q7 및 *B. cereus* 6E1 형질전환주들은 클로람페니콜을 10μg/ml되도록 첨가한 HCO배지에서 24시간 배양하였고 *B. subtilis* 168 형질전환주들은 클로람페니콜을 3μg/ml되도록 첨가한 2xSG 배지에서 24시간 배양하였다. 앞의 세 균주의 경우는 배양상등액 및 세포추출물의 효소역가를 각각 측정하여 합산하였고 *B. subtilis* 168 형질전환주의 경우엔 배양상등액의 역가를 측정하였다.

로 포자형성을 관찰하고 배양상등액의 셀룰라아제 역가를 측정하였다. Fig. 21 에 나타난 바와 같이 셀룰라아제의 발현이 *B. t.* 4D11 숙주균에서와 마찬가지로 포자형성과정과 밀접하게 연계되어 이루어짐을 확인하였다. 즉 *B. subtilis* 168균이 대수증식기를 지나 포자형성기로 진입하는 시기부터 발현되기 시작하여 포자형성이 진행되는 동안 셀룰라아제 생산이 이루어졌다. 이와 함께 본 발현시스템에 의한 셀룰라아제의 고발현이 숙주균의 성장에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 본 연구의 발현시스템은 세포 정지기에 목적 단백질이 발현되므로 목적 단백질의 과생산으로 인한 세포 성장저해 문제가 해결되어 세포에 독성을 나타내는 단백질의 생산에 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 특별한 발현 유도물질의 첨가 없이도 목적 단백질의 발현이 유도되어 목적 단백질의 생산 단가를 낮출 수 있다. 또한, 본 발현시스템은 발현된 단백질을 세포 외로 분비시키거나 세포의 자가분해에 의하여 배양액으로 노출시키기 때문에 목적 단백질의 회수가 용이하여 유용 효소 또는 단백질의 대량생산에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

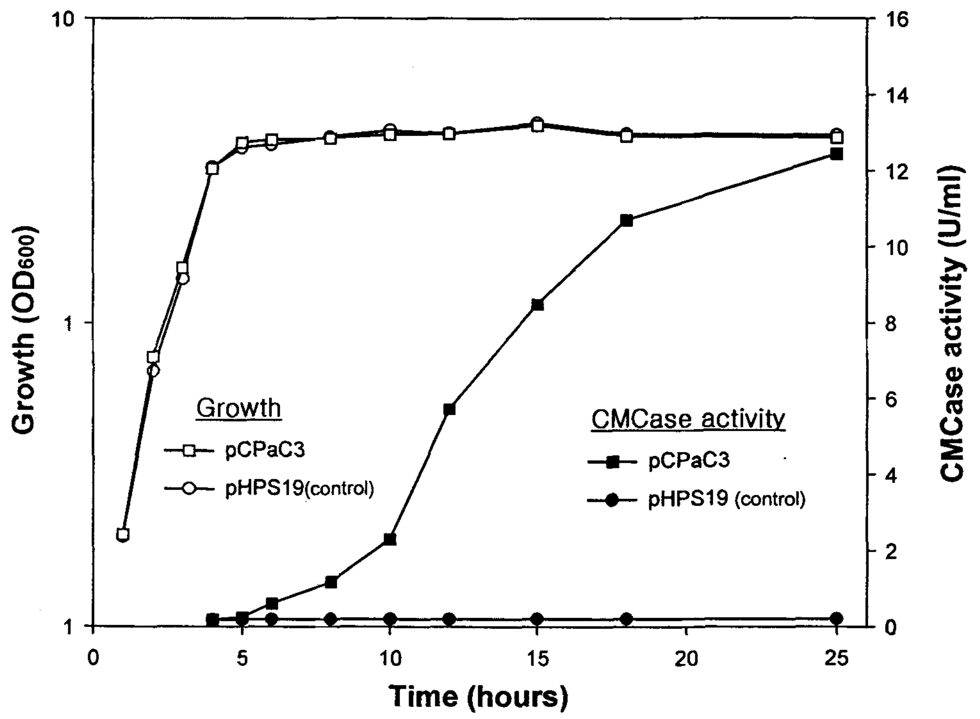


Fig. 21. Plasmid pCPaC3 및 대조구로서 pHPS19을 각각 함유하는 *B subtilis* 168 균 형질전환체들의 성장곡선 및 배양시간에 따른 CMCase역가

4. *B. licheniformis* 균을 이용한 효소생산균주 개발 및 발효공정 최적화

(1) *B. licheniformis* SK-2 균을 이용한 α-amylase 생산용 균주 개발

1) Chemical mutagenesis에 의한 *B. licheniformis* 균주의 개발

전 단계 연구를 통해 개발된 내열성 α-amylase(AmyL) 고생산균주 *B. licheniformis* SK-2 균의 효소생산성을 한 차원 높이고 동시에 다양한 외래효소를 고 생산하는 재조합 균주 제작을 위한 숙주균 개발을 목표로 SK-2 균에 대해 chemical mutagenesis를 시도하였다. 앞의 실험방법에서 기술한 바대로 *B. licheniformis* SK-2 균에 대해 NTG를 처리하였고 5% starch와 1% skim milk를 각각 함유하는 고체배지에 돌연변이주를 배양하면서 분해환이 가장 큰 변이주를 선별하였고 이 과정을 3차례 반복하여 얻은 결과를 Fig. 22 에 나타내었다. 흥미로운 점은 α-amylase 역가가 높아진 변이주들은 대개가 protease역가도 높아진 사실이다. 본 실험을 통해 protease와 α-amylase 역가가 가장 우수한 것으로 나타난 SM211균주를 최종 선별하여 배양시험을 실시하였다. 그러나 예상과 달리 SM211균주의 역가는 중간 단계 변이주인 SM2 및 SM21보다도 낮게 나왔고 모균주인 SK-2에 비해 크게 나아지지 않았다(Table 5). 참여기업에 제공하여 반복 실험을 해보았지만 마찬 가지였다. 여러 가지 상황을 고려해 볼 때 protease 역가가 함께 높아진 것이 문제인 것으로 판단되어 이번에는 SM211균을 출발균주로 하여 두 차례 mutagenesis를 하면서 protease는 저하되고 α-amylase 역가는 그대로 유지되는 변이주를 얻었다. 그중 몇 균주를 대상으로 배양시험을 거쳐 역가가 가장 높게 나오는 PN6균주를 최종 선발하였다(Fig. 23). PN6균을 SW2.0배지에 60시간 배양하여 배양상등액의 역가를 측정하였을 때 ml당 역가가 1000units 이상 되는 것으로 나타나 SK-2의 200 unit/ml 수준에 비해 크게 증가된 것을 알 수 있었다. 향후 PN6균을 재조합 균주 제작을 위한 숙주로 활용하였다.

2) *B. licheniformis*균 염색체상에서의 유전자 증폭에 의한 내열성 α-amylase(AmyL) 고생산 균주의 개발

가) Integration vector, pSI7 plasmid

Table 5. α-Amylase activities of cuture supernatants of SK-2 and its mutant strains

균주	α- amylase 역가 (units/ml)	
SK2	190	SW2.0 배지 37°C, 60hrs Flask 배양
SM2	770	
SM21	470	
SM211	380	

(A) (B)

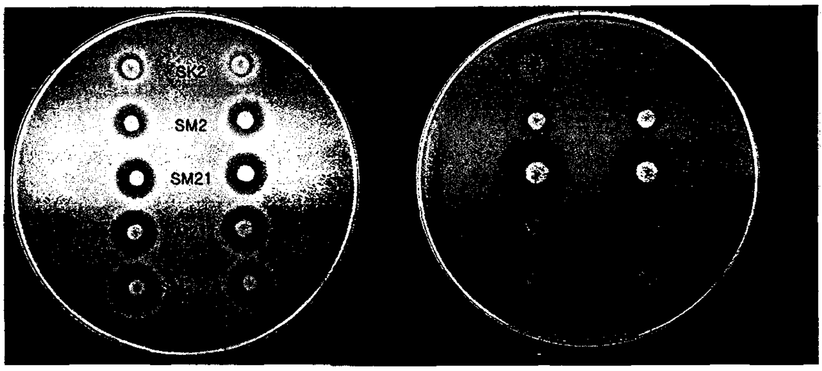


Fig. 22. Chemical mutagenesis에 SK2 균을 모체로 하여 얻은 변이주의 전분 분해력(A) 및 skim milk 분해력(B) 비교

Fig. 23. Chemical mutagenesis에 SM211 균을 모체로 하여 얻은 변이주의 skim milk 분해력 비교

Integration vector, pSI7 plasmid는 전단계 보고서에서 기술한 바 있으며 6.3kb의 크기를 갖는 plasmid로서, pUC19 vector에 pUB110 유래의 단편들을 subcloning한 것이다(Fig. 24). pUC19 vector 내에 2개의 ori$^+$단편을 가지고 있고, pUB110 유래의 kanamycin 저항성 유전자를 가지고 있다. 또한, replication initiation protein을 coding하는 온전한 rep 유전자와 Rep protein을 만들 수 없는 불완전한 rep 유전자의 일부 단편을 가지고 있다. pSI7 plasmid는 *E. coli*에서 작동하는 replication origin과 *Bacillus*에서 작동하는 replication system을 모두 가지고 있다. pSI7 plasmid를 *Bacillus* 내부로 도입을 하게 되면 rep 유전자의 발현에 의해서 Rep protein 이 생겨날 뿐 아니라, 2개의 ori$^+$를 가지고 있기 때문에 두 군데에서 nick-closing이 일어나게 되어 분리되게 되어있다.

나) α-amylase 유전자를 *Bacillus* 염색체 내부로 도입하기 위한 integration vector, pSI7α plasmid 제조

B. licheniformis SK-5 유래의 내열성 α-amylase 유전자(*amyL*)를 plasmid DNA상에서 발현시키는 대신에 *B. licheniformis* SK-2의 염색체 상에서 α-amylase 유전자를 integration시켜 α-amylase 유전자를 안정적으로 과잉 발현시키기 위한 integration vector, pSI7α를 제작하였다. Integration vector, pSI7α는 *B. licheniformis* SK-5 유래의 α-amylase 유전자를 subcloning한 것이다(Fig. 25). 7.9kb 의 크기를 갖는 pSI7α plasmid를 *B. licheniformis* 내부로 도입을 하게 되면 4.1kb의 크기를 갖는 플라스미드로 나누어지게 된다. pSI7α plasmid는 ori$^+$와 rep 유전자를 가지고 있어서 복제는 가능하지만 Km^r 유전자가 없기 때문에 kanamycin이 들어있는 배지에서 curing이 될 것이다. 또한, pSI7α plasmid는 ori$^+$ 와 Km^r 유전자를 가지고 있지만 불완전한 rep 유전자를 가지고 있어서 Rep protein을 만들지 못하기 때문에 복제가 불가능하다. 따라서 pSI7α plasmid 내부에 있는 α-amylase 유전자와 염색체상의 α-amylase 유전자간의 homologus recombination에 의해서 pSI7α plasmid가 염색체 내부로 integration된 *B. licheniformis* 형질전환체만이 kanamycin이 들어 있는 배지에서 자랄 수 있을 것이다.

다) 염색체상에서 α-amylase 유전자 증폭에 의한 고생산 균주의 개발

B. licheniformis SK-2 균주의 염색체 DNA에 pSI7a plasmid를 integration 시켜 얻은 형질전환체를 SK-50으로 명명하였다. 형질전환체 SK-50을 kanamycin 농도를 높이

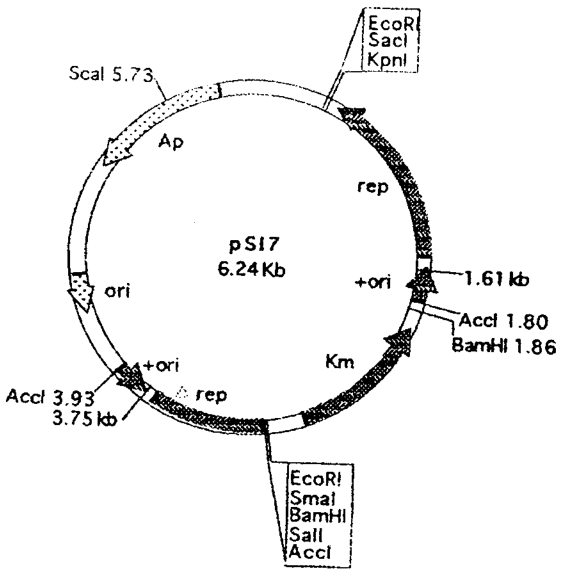


Fig. 24. Restriction map of pSI7

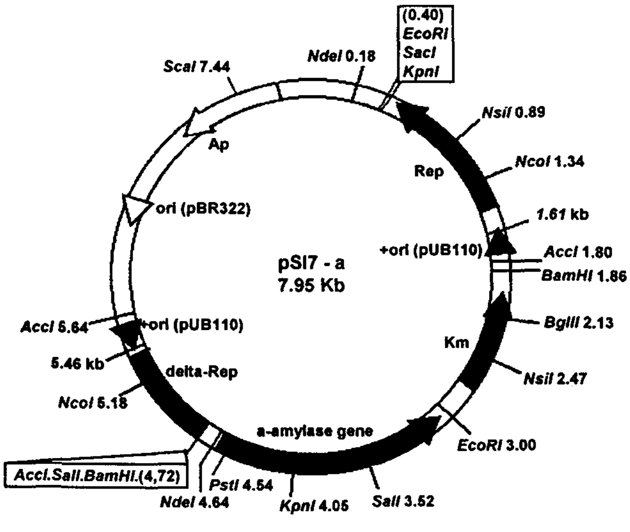


Fig. 25. Restriction map of pSI7 α

면서 (50μg/mℓ ~ 3mg/mℓ) 배양하여 염색체 DNA 내에서 α-amylase 유전자가 증폭된 균주의 선별을 시도였다. α-amylase 활성을 조사한 결과 200μg/mℓ kanamycin이 들어있는 BHI 배지에서 배양한 균주가 제일 높은 효소 활성을 보였다. 이 균주의 이름을 SK-200으로 명명하였다.

SK-2와 재조합 균주의 효소 활성을 조사하기 위한 배양조건은 kanamycin 항생제가 들어 있지 않은 LB 배지를 기본 배지로 하였고, 1 liter flask에 들어있는 50mℓ의 LB 배지에 각 균주를 접종하여 37℃에서 250 rpm으로 배양하면서 24 시간 간격으로 배양액을 sampling 하였고 효소 활성은 DNS 방법으로 측정하였다. 효소 활성 측정결과는 Table 6에 정리된 바에서 알 수 있듯이 Flask 배양 결과, 48 시간 배양에서 최대 활성을 보였고 SK-50은 SK-2 에 비해 약 3.3배, SK-200 은 약 3.8배의 효소 활성을 보였다.

3) *cry3* 프로모터 및 STAB을 이용한 α-amylase 고생산 균주의 개발

B. licheniformis 변이주 PN6를 숙주로 하고 여기에 α-amylase 자체 프로모터, *cry3* 프로모터 및 mRNA 안정화 인자인 STAB를 지닌 발현 시스템에 α-amylase 유전자를 실어 제작한 균주로 현재 실험실 배양 조건에서 3,200 units/mℓ 생산수준에 도달하였으며 이를 참여기업에 제공하여 현장에서의 생산성을 분석중인데, 10,000 units/mℓ 이상의 수준에 도달할 수 있을 것으로 기대된다. 단계별 *Bacillus* 개발균주를 참여기업에 여러 차례 제공하여 10,000 L 규모 이상의 생산 시험을 여러 차례 수행함으로써 대량생산을 위한 공정을 개발하였다.

cry3 프로모터와 STAB의 유전자는 PCR반응을 통하여 원하는 유전자 fragment를 증폭시켜 이용하였고 PCR primer로는
Upstream: 5'-GAGGACTCTCCCTGCTATTACGAGATTAGT-3'과
Downstream: 5'-CCGGGGATCCTTATCATAATACATAATT-3'을 사용하였다. PCR반응은 94℃ 5분, 94℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분 으로 35 cycle을 수행하고 72℃에서 final elongation으로 7분 수행한 결과 1.0 kb와 1.3 kb의 fragment를 얻었다. 두 개의 fragment를 T-vector에 cloning 하고 1차 염기 서열을 분석하였다. 위에서 얻은 프로모터와 mRNA 안정화 인자를 우리실에서 개발한 발현시스템에 장착시키기 위하여 개발된 plasmid vecotr로 *B. cereus*에서 분리한 pBC16을 모체로 하여 pUBC1을 개발하였고, 이로부터 *BamHI* site 하나를 제거한 pUBC2 플라스미드를 유도하여 이용하였다.

Table 6. α-Amylase activities of cuture supernatants of SK-2 and its derivatives

(단위 : units/mℓ)

배양시간 / 균주	24 시간	48 시간	72 시간	96 시간
SK-2	101	126	120	122
SK-50	308	422	370	366
SK-200	307	489	437	424

pUBC2 플라스미드를 *BamHI* 과 *SacI* 로 double digestion하여 elution한 플라스미드에 PCR반응을 통하여 얻은 *cry3* 프로모터와 mRNA 안정화 인자, STAB를 ligation하여 얻은 vector를 다시 *BamHI* 으로 digestion하였고 여기에 *BamHI* 으로 digestion하여 얻은 α-amylase 유전자 조각을 ligation하여 최종적으로 exoression veector를 제작하였고 대략적인 제작과정은 Fig. 26 에서 보는 바와 같다.

이렇게 제조한 exoression veector는 PN6균주에 형질전환 시켜 PN61, PN62, PN63의 형질전환체를 얻었다. PN61은 pUBC2 vector만을 그리고 PN62는 pUBC2에 α-amylase 유전자만을 부착시킨 vector를 PN63은 *cry3* 프로모터와 mRNA 안정화 인자, STAB, α-amylase 유전자 모두를 부착시킨 vector를 형질전환시켜 얻은 형질전환체이고 이들의 α-amylase 활성의 측정은 BHI+1% lactose 배지와 SW2.0 배지에 각 형질전환체를 배양하여 BHI+1% lactose 배지의 배양액은 30시간에서 SW2.0 배지의 배양액은 80시간에서 1㎖ harvest하여 얻은 상등액을 DNS법에 의해서 측정하였으며 측정 결과는 Table 7 과 Table 8 에서 보는 바와 같이 PN63 균주의 효소 활성이 PN61보다 3배정도 증가됨을 알 수 있다.

(2) *Bacillus licheniformis* 균을 이용한 celluase 생산용 균주 개발;

1) α-amylase 프로모터(P_{amyL})를 이용한 cellulase 발현시스템의 개발

pSHC338 plasmid를 주형으로 하여 P_{amyL}과 *celS* structural gene을 각각 PCR을 이용하여 얻은 후 이를 *B. cereus*에서 분리한 pBC16을 모체로 하여 개발된 pUBC2 vector의 *Bam*HI 위치에 도입하여 재조합 plasmid pUBC40을 제조하였다(Fig. 27). pUBC40을 *B. licheniformis* PN6에 도입하여 형질전환 균주 PN40을 제작하였다. 그러나 cellulase의 생산성은 1 units/㎖정도로, *B. subtilis* 모균의 cellulase 생산성(< 0.1 units/㎖)의 10배정도로서 예상보다 낮은 생산성을 나타냈다. 또한 *B. licheniformis* KCTC2215에 pSHC337, pSHC338 및 pSHC339를 도입시켜 BL2, BL3 및 BL4 균주를 제작하였다. BL2는 3.3units/㎖, BL3는 1.3units/㎖ 그리고 BL4는 1.93units/㎖의 값으로 BL2가 BL3보다 약 2.5배의 역가를 나타냈는데 각 각 200bp 길이의 amylase 프로모터와 *celBS*의 signal sequence를 갖는 것(pSHC337), 300bp 길이의 amylase 프로모터와 *amyL*의 signal sequence를 갖는 것(pSHC338), 200bp 길이의 amylase 프로모터와 *amyL*의 signal sequence를 갖는 것(pSHC339)으로서 프로모터의 길이와 signal sequence의 특징을 갖는

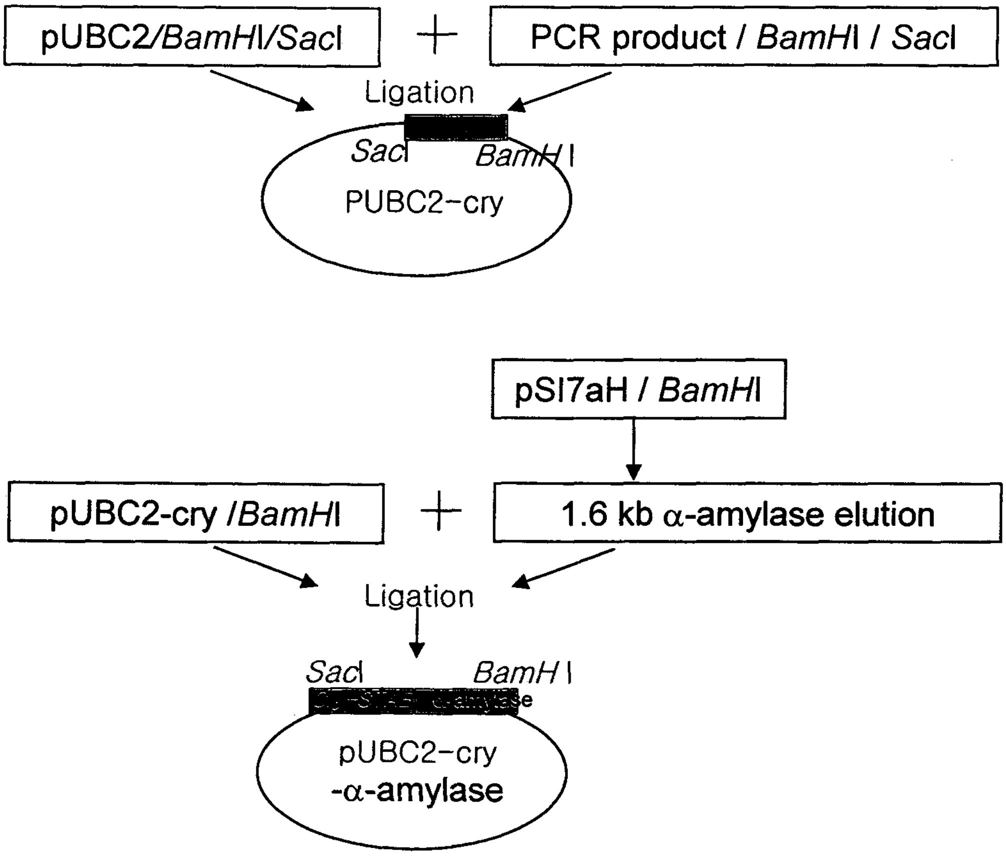


Fig. 26. Construction of P_{cry3}-STAB-*amyL* expression vector

Table 7. α-Amylase activities of of cuture supernatants of recombinant strains *B. licheniformis* PN61, PN62 and PN63

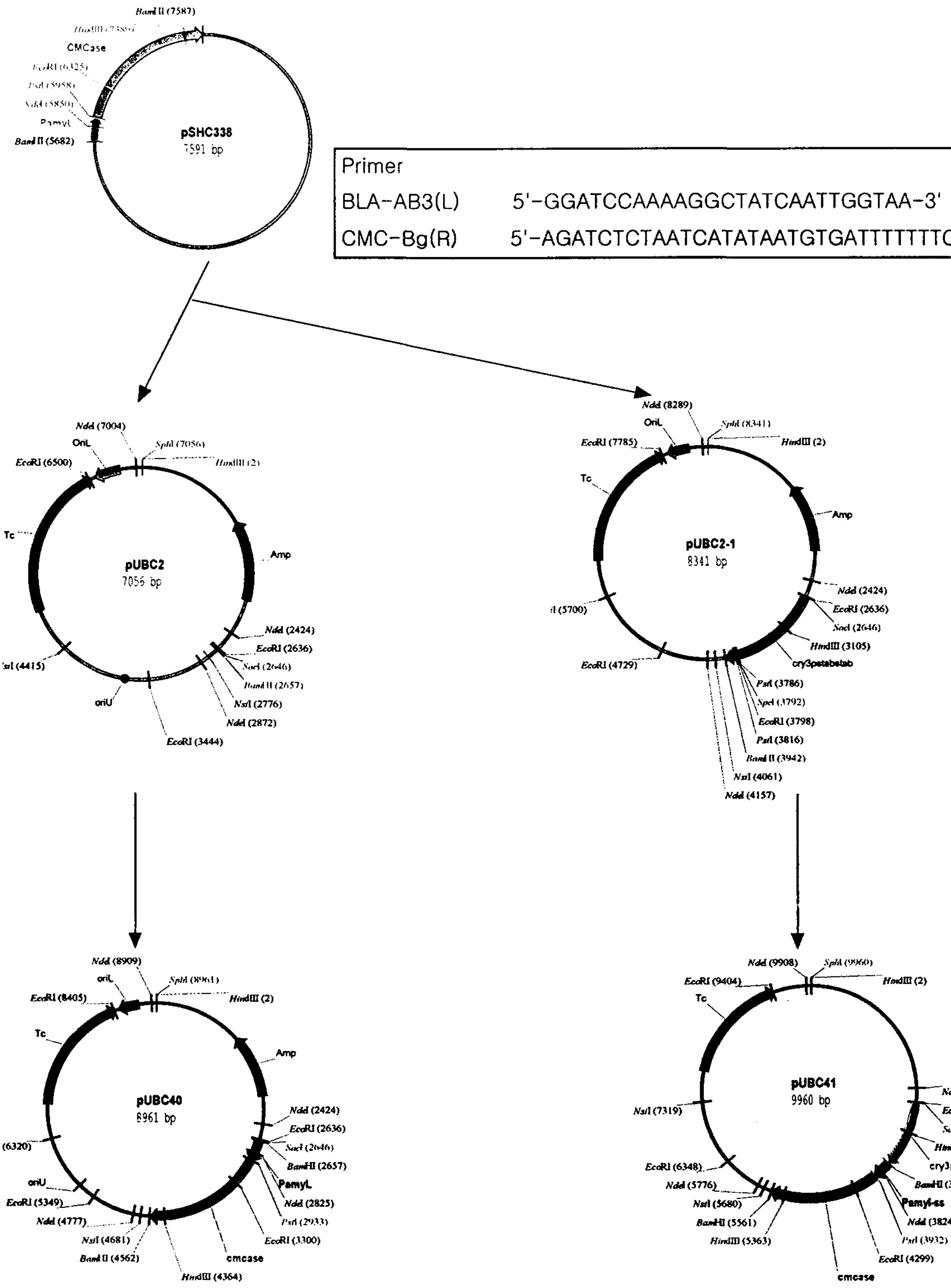
Strains	descriptions	units/㎖	unit/㎖/OD
PN61	PN6(pUBC2)	94.2	19.3
PN62	PN6(pUBC2+ α-amylase)	119.0	26.5
PN63	PN6(pUBC2+P_{cry3}+STAB+ α-amylase)	148.8	29.8

Bacillus strains were grown in BHI+1% lactose medium for 30 hrs

Table 8. α-Amylase activities of cuture supernatants of recombinant *B. licheniformis* strains PN61, PN62 and PN63

Strains	**descriptions**	**units/㎖**
PN61	PN6(pUBC2)	859.3
PN62	PN6(pUBC2+ α-amylase)	1132.8
PN63	PN6(pUBC2+P_{cry3}+STAB+ α-amylase)	3254.3

Bacillus strains were grown in SW2.0 medium for 80 hrs



Primer	
BLA-AB3(L)	5'-GGATCCAAAAGGCTATCAATTGGTAA-3'
CMC-Bg(R)	5'-AGATCTCTAATCATATAATGTGATTTTTTTCG-3'

Fig. 27. Construction of expression vectors pUBC40 and pUBC41

다.

2) SEP 프로모터 및 STAB을 이용한 cellulase 발현시스템의 개발

α-amylase 프로모터, *cry*3 프로모터 및 STAB으로 구성된 발현시스템에 cellulase 유전자를 실어 재조합 plasmid pUBC41을 제작하여 *B. licheniformis* PN6균을 숙주로 형질전환 시킨 균주 PN41을 제작하였다. pUBC41은 pUBC2의 *SacI*, *Bam*HI 자리에 SEP 프로모터와 mRNA stabilizer인 STAB을 도입한, pUBC2-1 vector의 *Bam*HI을 이용하여 SEP 프로모터 및 STAB, P_{amyL}와 *celBS* gene을 갖는 발현 시스템을 갖추고 있다(Fig. 27). PN41은 2 units/㎖의 생산성을 나타내었는데 예상보다 크게 낮은 수치이다.

3) *B. licheniformis*균 염색체 상으로의 *celBS* 유전자 도입 및 증폭에 의한 고생산 균주의 개발

B. licheniformis SK2 균주의 α-amylase 유전자 부위에 pSI7-*celBS*를 삽입하여 SKC 균주를 제작하였다. pSI7-*celBS* plasmid는 SK2의 염색체 상에서 single corss-over가 일어나도록 α-amylase 유전자 부위의 한 part인 daL, replicaton origin 및 marker로서 kanamycin resistance 유전자를 갖는다(Fig. 28). α-amylase 유전자 5′ flanking region에 *celBS*가 삽입된 균주를 CMC와 kanamycin을 포함하는 배지에서 congo-red로 염색하여 halo를 보이며 자라는 transformants를 선별하였고 원하는 위치에만 삽입된 균주를 얻기 위해 transformats들을 대상으로 chromosomal DNA를 수득하여 *Bam*HI과 *Sal*I으로 southern blot analysis 하여 SKC 균주를 완성하였다. 실험실 배양 조건에서 SKC 균주는 약 60 units/㎖의 생산성을 보였다. pSI7-*celBS* plamid에는 chomosomal DNA 상에서 kanamycin으로 증폭할 수 있는 시스템을 갖추고 있으므로 *celBS*를 더 증폭시킨다면, SKC보다 역가가 증가된 균주를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

B. licheniformis SKC 균주는 α-amylase의 start codon 상위 부위에서 삽입이 일어나 α-amylase의 활성이 그대로 남아 있다. 모균주인 SK2 균주 및 이로부터 유도된 균주들은 α-amylase 고생산 균주이므로 두 가지 다른 extracellular enzyme을 생산하도록 하는 데에는 문제가 있다. PN6는 1000units/㎖의 α-amylase를 생산할 수 있는 균주로 PN6의 α-amylase를 *celBS* gene으로 disruption 시켜 cellulase를 발현시킨다면 cellulase 과잉생산 균주를 제작 할 수 있을 것이다. PN6의 α-amylase를 disruption 시

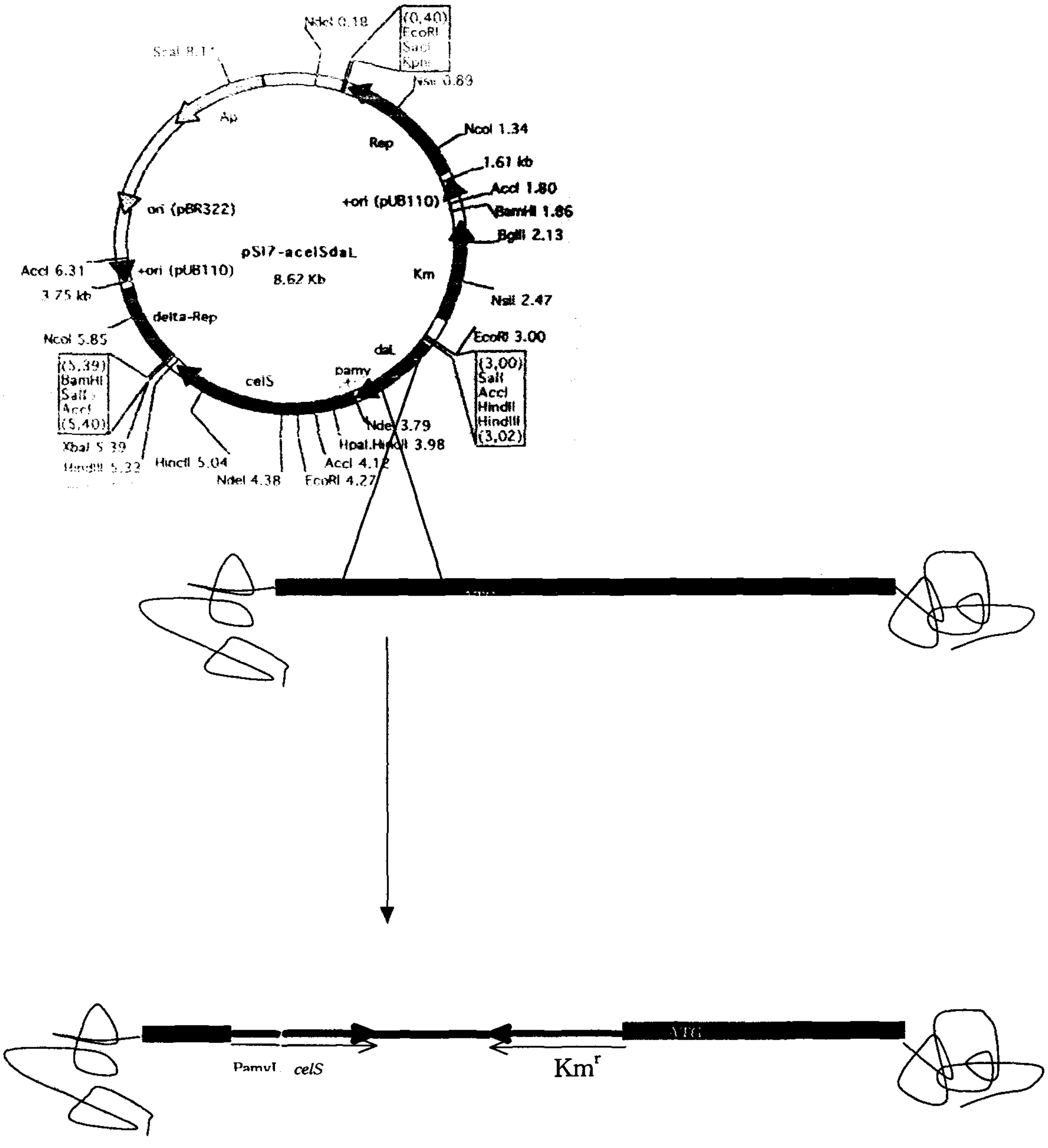


Fig. 28. A strategy for chromosomal insertion of *celBS* gene in the region of α-amylase gene(*amyL*) by homologous recombination (single crossing over)

키기 위해 *amyL*의 5' flanking region과 3' flanking region사이에 *celBS*와 Tc reistance gene을 삽입하여 pDisamyL-*celBS*를 제작하고 있다(Fig. 29).

5. Molecular evolution을 통한 효소의 specific activity증진

(1) Subsequent gene reassembly and library screening

GFL-1A 라이브러리에서 탐색한 변이 cellulase중 표면활성이 가장 높은 20개의 클론들을 다시 GFL-I을 행하여 GFL-1B 라이브러리를 제조하였다. GFL-1B 라이브러리로부터 상기한 방법들을 통하여 상대적으로 활성이 높은 변이주들을 선별하였다(Fig. 30). Fig. 31 는 EPL, GFL-1A, 그리고 GFL-1B 라이브러리로부터 cellulase 비활성이 가장 많이 증가된 클론들 20개를 DNS법으로 전세포 활성을 측정한 결과이다. Error-prone PCR(EP-PCR)법만으로 제조한 라이브러리(EPL)와 EP-PCR을 행한 후 GFL-1으로 diversity를 증가시킨 후 제조한 라이브러리(GFL-1A)의 경우 라이브러리의 규모는 비슷하지만, 돌연변이 탐색 결과 GFL-1A 라이브러리에서 약간 더 높은 돌연변이들이 존재함을 알 수 있었다. 이는 EP-PCR로서 제조 가능한 라이브러리보다 이를 한번 더 GFL-1을 행함으로써 제조 가능한 라이브러리의 규모가 더 커지기 때문에 (3x cross over의 경우 103배), 실제 제조하여 탐색한 라이브러리의 수는 동일하더라도 활성곡선의 경우 Fig. 31 에서와 같이 보다 넓은 활성 분포도를 나타낼 수 있으며, 더 높은 활성의 돌연변이주가 탐색될 가능성이 높다. 활성이 가장 높게 증가된 돌연변이 20개 클론을 모아 GFL-1을 행하였을 때 활성에 좋거나 나쁜 영향을 미치는 돌연변이들이 다시 섞임으로써 좋은 영향을 미치는 돌연변이만이 축적된 돌연변이들을 포함하는 라이브러리를 기대할 수 있을 것이다. 실제로 GFL-1B 라이브러리로부터 탐색한 결과 EPL이나 GFL-1B에서 탐색한 최고 활성 돌연변이주보다 2배 이상 높은 활성의 돌연변이주들이 탐색되었다. 최종적으로 GFL-1을 1 cycle 돌려 얻은 GFL-1B 라이브러리로부터 탐색된 돌연변이들 중에서 가장 높은 활성을 보인 돌연변이주는 wild-type에 비하여 약 18배 비활성이 증가하였다. 이는 빙핵활성 단백질에 융합된 상태로 측정된 결과이며, cellulase 자체의 비활성 증가를 정확히 측정하기 위해서는 free-form으로 발현시킨 후 활성 측정을 해야할 것이다.

(2) Sequence analysis of cellulase variants

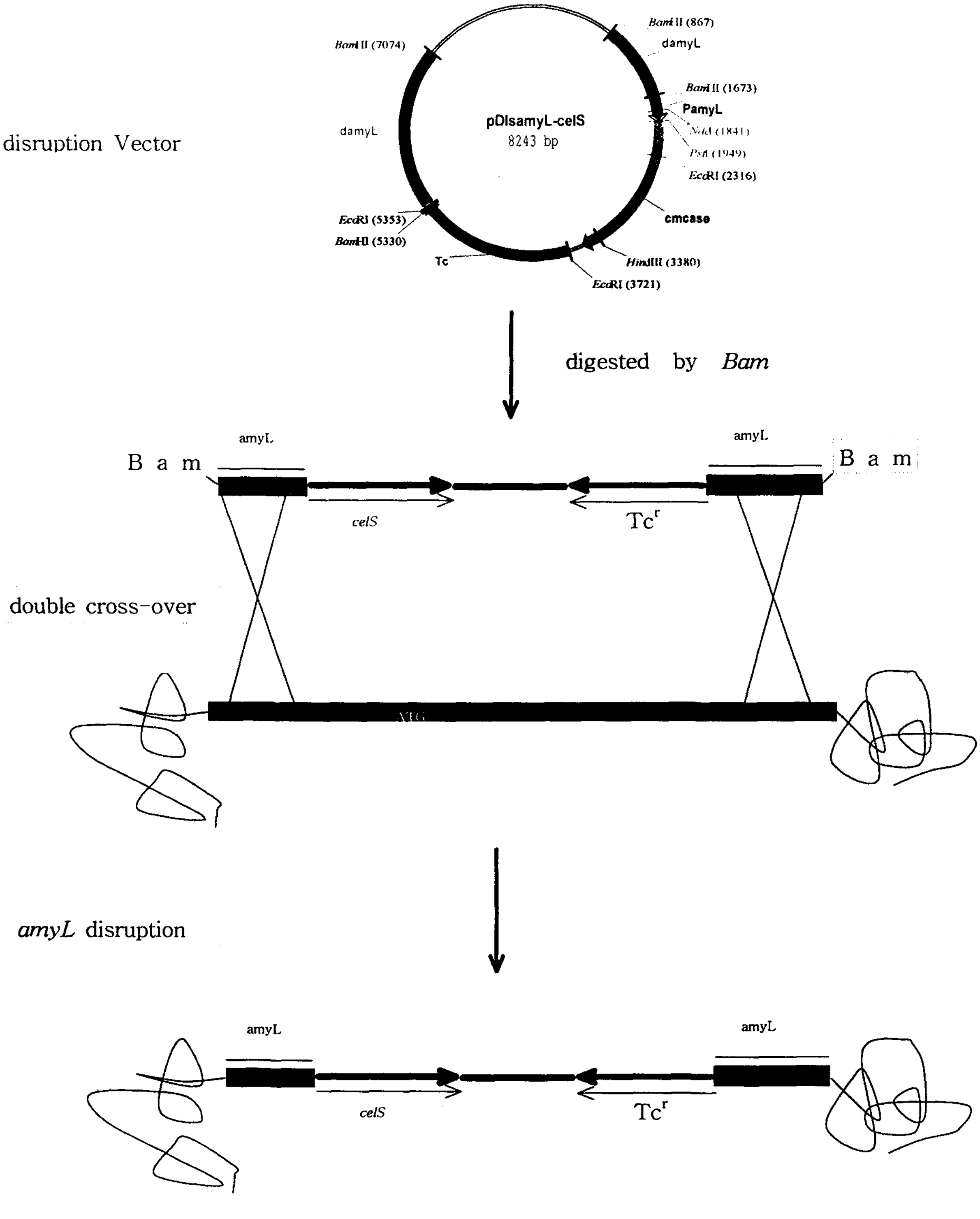


Fig. 29. A strategy for disruption of α-amylase gene(*amyL*) with *celBS* gene (double crossing over)

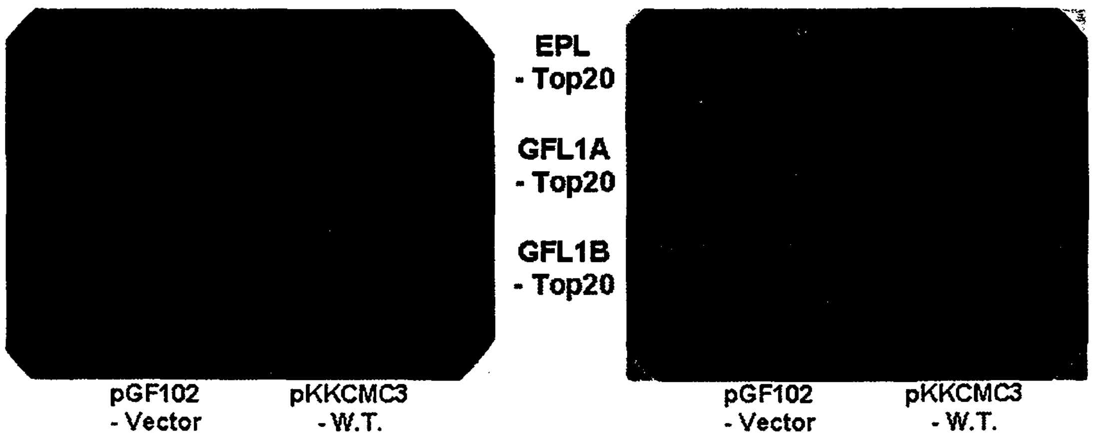


Fig. 30. CMCase 효소 변이 라이브러리로부터 탐색한 돌연변이들의 CMC 고체 배지에서의 활성 비교.

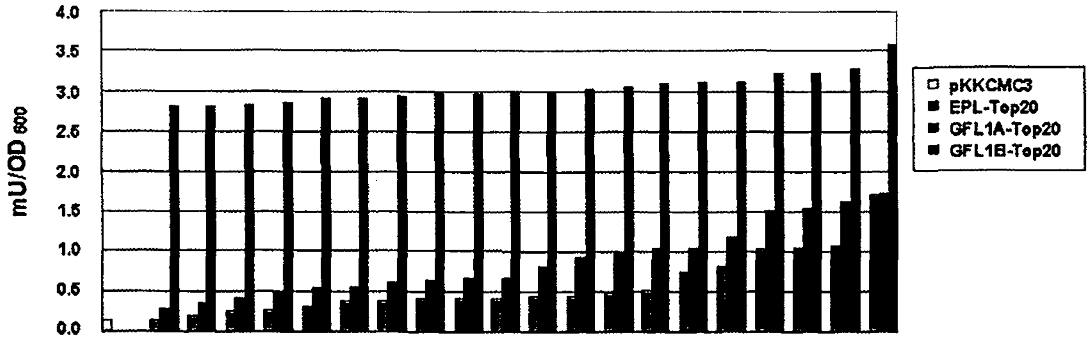


Fig. 31. CMCase 효소 변이 라이브러리로부터 탐색한 돌연변이들의 전세포 활성.

GFL-1B에서 탐색한 클론들중 활성이 가장 높은 10개의 클론들의 sequence를 분석하였다. Sequencing은 양쪽방향으로 두 번씩 행하였으며, 결과는 아래 Table 9 와 같다. 모든 돌연변이의 경우 226번째 아미노산인 aspartic acid가 tyrosine으로 치환되었음을 알 수 있었다.

(3) α-Amylase 활성과 균주 생육의 연관성

효소 라이브러리로부터 원하는 방향으로 진화된 효소 돌연변이를 초고속으로 탐색하기 위하여 표면 발현된 효소의 활성과 숙주세포의 증식속도를 연결시킨 새로운 방법을 확립하였다. 대부분의 산업용 효소의 경우, 특히 endoglucanse류는 숙주세포가 증식에 이용할 수 없는 폴리머를 가수분해하는 활성을 가지고 있다. 따라서 세포 표면에서 효소반응이 일어나도록 하여 반응산물을 숙주세포가 증식에 이용하도록 하면, 활성이 증가된 효소를 발현한 미생물이 상대적으로 빨리 증식할 것이다.

단백질을 암호화하고 있는 유전자를 무작위 돌연변이를 시키면 활성을 잃어버리는 돌연변이들이 상당수 생성되는데, 위와같이 효소 반응 산물에 숙주의 증식을 link시켜서 최소배지에서 탐색한다면, 적어도 효소 활성을 잃어버리지 않은 돌연변이 효소들만이라도 탐색할 수 있게 된다. 따라서 고온에서 활성을 갖는 효소의 분자적 진화와 같이 세포 증식 가능환경에서 직접 탐색이 안되는 경우, 일단 활성이 있는 효소 라이브러리를 최소배지에서 1차 탐색을 한후 원하는 환경에서 2차 탐색을 할 수 있기 때문에 시간과, 노동력, 비용을 상당히 절감하는 혁신적인 방법이 될 수 있다

본 연구에서는 먼저 표면발현된 AmyL이 가용성 전분을 분해하여 세포 증식에 이용 가능한 malotse를 생성하는지를 TLC를 통해 확인하였다. 그 결과 그림 3에서와 같이 가용성전분을 AmyL로 가수분해하면 1당에서 6당까지의 다양한 말토올리고당이 생성됨을 알 수 있었다(Fig. 32).

앞에서 언급한 바와 같이 가용성전분이 포함된 최소배지 (M9/soluble starch)에서 비활성이 증가된 돌연변이를 탐색할 수 있는지를 확인하기 위하여 AmyL을 표면발현한 대장균과 control 대장균을 M9/soluble starch 최소배지에서 생육시켜 콜로니 형성을 관찰하였다. 상기의 두종류의 대장균을 28℃에서 36시간 고체 배양한 결과 예상한 바와 같이 AmyL을 표면발현한 대장균의 생육이 벡터만을 함유한 대장균에 비해 월등히 뛰어났다 (Fig. 33). 이 결과는 표면발현된 AmyL의 활성에 따라서 M9/soluble starch 배지에서

Table 9. 선별된 변이 CMCase들의 아미노산 서열 분석 결과

Mutants	Amino acid substitutions	No. of silent mutations
1	Q140P, D226Y, S397N	1
2	G100A, M112R, E114Q, W117C, D226Y	2
3	D84Y, T89A, G100A, G101R, D104V, M112R, E114Q, W117C, D226Y	3
4	K150R, D226Y, S283G, Q428R	1
5	D226Y, T432A, N453D	1
6	D77A, S78T, D84Y, T89A, G100A, G101R, D226Y, Q378*	3
7	D226Y	1
8	D226Y, D385G, N473D	2
9	D226Y, M365L, T383P, D385G, N473D	2
10	Q140P, D226Y, S283G, I339L, D385G, Q428R, N473D	1

Note. * indicates stop codon, UAA.

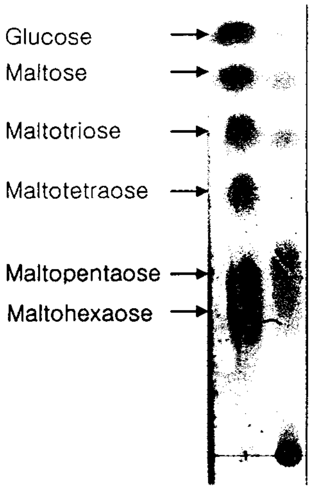


Fig. 32. AmyL의 가용성전분 분해물 분석

lane 1. Maltooligosaccharide standards

lane 2. AmyL에 의한 가용성전분의 가수분해물

pGF102/JM109 pINP-AmyL/JM109

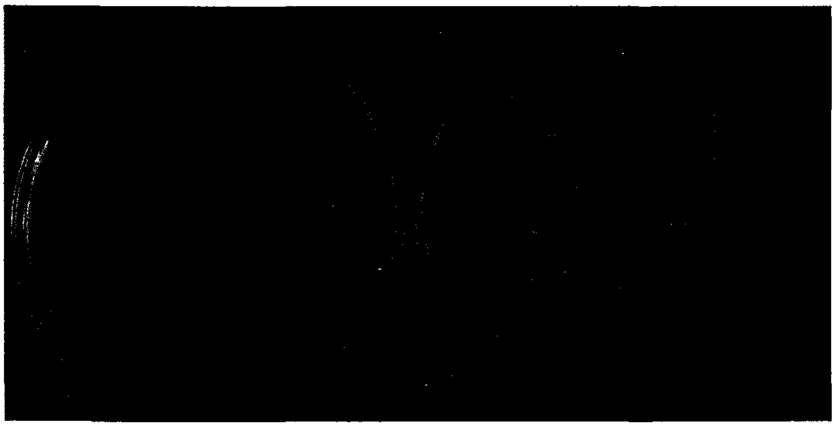


Fig. 33. 최소배지에서 AmyL의 발현에 따른 생육속도의 차이

콜로니의 크기가 달라진다는 것을 확인할 수 있는 결과였다. 따라서 반응 생성물인 maltooligosaccharide를 숙주세포가 이용하도록 하는 growth-linked evolution을 수행하였다.

(4) α-Amylase 변이주의 탐색

Error 유발 PCR을 이용하여 3회의 library generation 및 고속 탐색 실험을 수행하여 평판활성을 보이는 콜로니들을 1차로 선별하여 반복실험을 수행하였다. 먼저 error 유발 PCR을 통해 만들어진 pINP-AmyL 변이체 라이브러리를 대장균 JM109 균주를 형질전환 시킨 후 전분이 1% (w/v) 함유된 M9-starch 최소배지에서 생육시켰다. α-amylase 활성을 보이는 변이주들은 분해된 말토올리고당을 탄소원으로 사용하여 생육하므로 상대적으로 생육 속도가 빠르므로 생육 속도가 빠른 변이주들을 다시 M9-starch 최소배지와 potato starch (0.5 %, w/v)가 함유된 LB 배지에 옮겨 평판 활성을 측정하였다.

그 결과 원래의 AmyL보다 뚜렷하게 증가된 콜로니 중에서 4개의 변이체를 선정하였고 이를 다시 하나의 평판에 접종하여 본 결과 역시 4개의 변이체 모두 뚜렷하게 활성이 증가되었음을 알 수 있었다. 또한 이 4개의 변이체로부터 plasmid DNA를 회수하여 대장균 JM109에 retransformation 시킨 결과 역시 동일한 활성을 보이는 것으로 미루어 보아 본 활성은 변이가 일어난 DNA로부터 유래함을 확인하였고 위에서 선정된 균주들은 명확히 활성이 증가된 변이체임을 확인 할 수 있었다(Fig. 34). 따라서 이 네 가지 변이체의 plasmid DNA를 각각 pEAL1, pEAL2, pEAL3, pEAL4라고 명명하였다.

(5) AmyL 변이체의 활성 측정

위 4가지 변이체의 DNA (pEAL1, pEAL2, pEAL3, pEAL4)로 형질전환시킨 대장균 JM109와 원래의 α-amylase를 표면발현시킨 대장균 JM109의 비활성을 측정하였다. 상기 5종류의 대장균을 LB 배지에 접종한 후 25℃에서 키우고 600 nm에서의 OD가 0.4가 되었을 때 1mM 농도가 되도록 IPTG로 induction시켰다. 이후 16시간 배양한 후 600 nm에서의 OD를 측정하여 보정하였다. 원심분리를 통해 상등액과 cell fraction(페리플라즘 및 세포내 분획)으로 나누고 균체를 생리식염수로 한차례 washing을 실시한 후 초음파 분쇄하여 60℃에서 10분간 amylase 활성을 측정하였다. 그 결과 상등액에서와 periplasmic fraction에서 공히 약 4배의 활성증가를 나타내었다(Fig. 35). 이를 통해 짧은

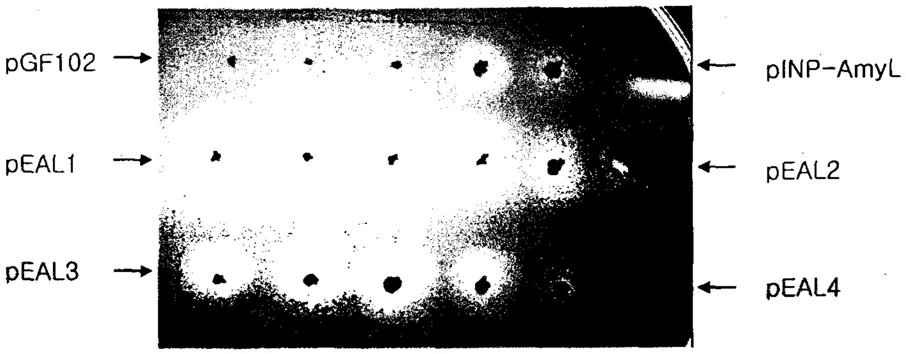
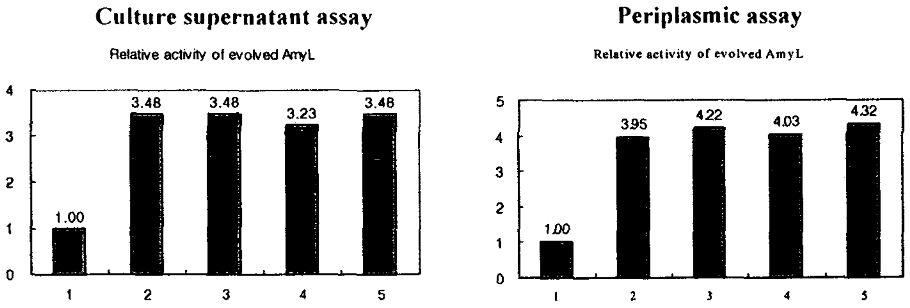


Fig. 34. AmyL 변이체의 평판 활성



1. pGF101-BLA
2. pEAL1
3. pEAL2
4. pEAL3
5. pEAL4

Fig. 35. AmyL 변이체의 상대 활성 비교

시간 내에 비활성이 증가한 α-amylase를 효소를 확보했음을 확인할 수 있었다.

(6) Cellulase 변이체의 고발현시스템 구축

DNA shuffling 방법으로 활성이 증가된 evolution cellulase gene(*celBS*)을 갖는 pKKCMC vector를 주형으로, CMC-N과 CMC-Bg를 primer로 해서 증폭된 산물과 pSH338을 주형으로 BLA-AB3와 R-1405를 primer로 해서 증폭한 산물을 이용해서 over-lay PCR을 수행하였다(Fig. 36). 그 결과 evolution된 cellulase를 amylase promoter를 이용해서 발현될 수 있도록 하였다. 이 산물은 pGEM T-easy(promega)에 삽입 후 *Bam*HI과 *BglII*로 절단하여 pUBC2와 pUBC2-1의 *Bam*HI 위치에 각 각 삽입하여 pUBC42 (P*amyL*+evolution *celS*)와 pUBC43 (PSEP+P*amyL*+evolution *celBS*)을 제작하였고 이를 도입한 *B. licheniformis*균의 cellulase생산성을 분석중이다.

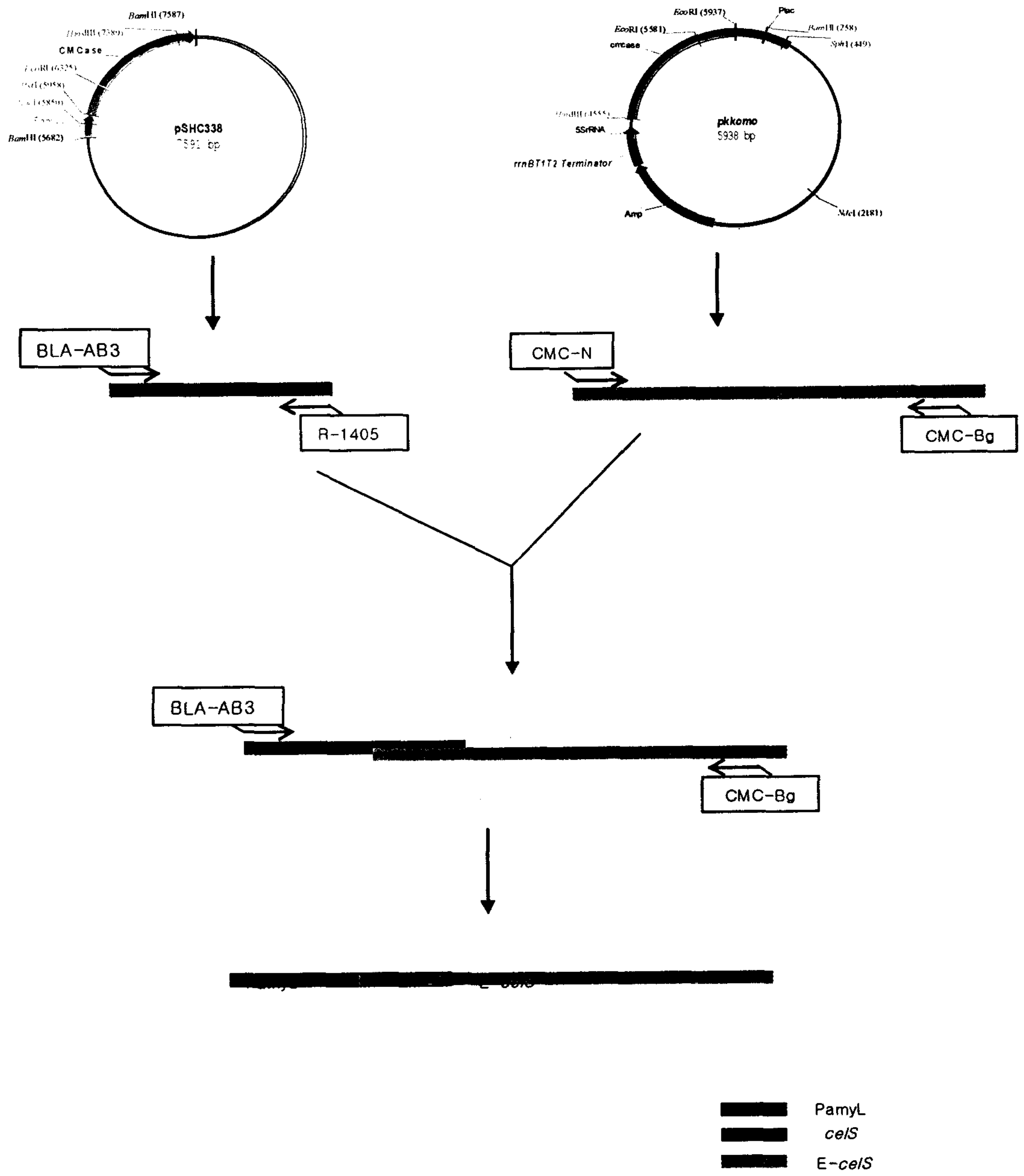


Fig. 36. A PCR strategy for the construction of cellulase expression vectors pUBC42 and pUBC43.

여 백

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구에서는 우선 *Bacillus* 균주 개발을 위한 기반기술을 구축하고자 노력하여 소기의 성과를 얻었다. 효소생산 숙주로 이용하고자하는 *B. licheniformis*의 경우 geneus *Bacillus*의 type species인 *B. subtilis* 와는 달리 유전자 재조합에 필요한 기반기술이 구축되지 않아 연구초기에 애로가 많았으나 이를 극복하고자 vector를 개발하였고, electroporation 및 protoplast를 이용한 형질전환방법을 확립하였다. 또한 유용 유전자를 *B. licheniformis*균의 염색체 DNA 내로 도입, 증폭시켜 발현을 안정되게 극대화시키는 기술도 개발하였다. 이러한 기술은 본 연구와 관련된 효소생산을 위한 균주개량 뿐만 아니라 *B. licheniformis*를 이용한 다양한 연구에서 이용될 수 있어 그 파급효과가 클 것이다.

효소 고생산에 이용할 수 있는 *Bacillus* 숙주균의 개발도 적극 추진하여 *B. licheniformis*균, *Bacillus* sp. 79-23균, *B. thuringiensis*균 등을 숙주로 이용한 효소 생산 시스템을 구축하였고 79-23균에 대해서는 특허출원 하였다. *B. licheniformis*균을 여러 차례 돌연변이시켜 얻은 PN6 균주는 내열성 α-amylase 뿐만 아니라 다른 산업용 효소의 생산에도 이용할 수 있는 유용한 숙주로 판단된다.

*Bacillus*균 특수 프로모터를 이용한 발현시스템 개발에 많은 노력을 기울여 우수한 성과를 얻었다. 본 연구에서는 *Bacillus* 속 균을 숙주로 하고, 포자형성과정 중에 발현되는 특성을 지닌 *B. t.*균의 독소단백질유전자의 발현시스템(SEP)을 이용하여 효소단백질 고발현시스템을 개발하는데 성공하였고 특허를 출원하였다. 이 고발현 시스템은 *Bacillus* 속 숙주균의 배양과정중 대수증식기가 지나고 포자를 형성하는 시기에 목표로 하는 효소 유전자를 고발현 시킴으로써 세포의 성장에는 영향을 미치지 않고 효소단백질을 높은 수준으로 생산하며 생산된 효소는 세포 외로 분비되거나 세포의 자가분해(autolysis)에 의해 배양액 중에 노출되어 쉽게 회수할 수 있는 새로운 시스템으로 활용가능성이 크다.

위에서 기술한 숙주균 및 효소단백질 발현시스템을 이용하여 섬유가공용효소 생산균주 개발 및 발효공정 최적화 목표를 달성하였다. Cellulase 생산용 *Bacillus* 균주 개발의 경우 두 가지 균주를 개발하였다. 하나는 *B. thuringiensis*균을 숙주로 하고 SEP 프로모터와 mRNA 안정화 인자 STAB을 이용하여 개발한 균주(SH845)인데 300 units/ml의 생산성에 도달하였다. SH845균주를 참여기업에 제공하여 11,000 IU/g의 시작품(분말형태)

을 제조한 바 있다. 두 번째 균주는 *B. licheniformis*균을 숙주로 하고 α-amylase 프로모터, SEP 프로모터 및 STAB을 지닌 발현시스템에 cellulase유전자를 실어 제작한 균주로 현재 생산성을 분석중인데 높은 생산성이 기대된다.

α-Amylase 생산용 *Bacillus* 균주 개발의 경우 *B. licheniformis* 변이주 PN6를 숙주로 하고 여기에 α-amylase 자체 프로모터, SEP 프로모터 및 STAB을 지닌 발현시스템에 α-amylase 유전자를 실어 제작한 PN63 균주로 현재 실험실 배양조건에서 3,200 units/ml 생산수준에 도달하였고 이를 참여기업에 제공하여 현장에서의 생산성을 분석중인데 15,000 units/ml 이상의 수준에 도달하였고 추가 배양시험에 의해 더욱 증가될 수 있을 전망이다.

한편 molecular evolution을 통한 효소의 specific activity증진연구를 추진하여 목표로한 성과를 거두었다. DNA shuffling 방법에 의한 diversity 창출 기술과 cell surface display 방법에 의한 high-throughput screening 기술을 바탕으로 cellulase 및 α-amylase의 specific activity가 5배 이상 증가된 효소변이체를 개발하였으며, 이 기술은 향 후 효소 초고속 개량 및 이용기술의 개발에 있어서 큰 비중을 차지할 것으로 예상되는 바 본 연구를 통해 관련 기술을 구축하고 응용 경험을 확보한 것은 의미가 크다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

본 연구를 통하여 섬유가공용 효소의 산업적 생산에 필요한 많은 기술과 유전자원 등을 확보하였지만 그동안 유전체연구의 급속한 진전, molecular evolution기술의 획기적 발전 등 연구환경이 계속 변하고 있어 이를 이용한 추가연구의 필요성이 제기되고 있고 또한 본 연구에서 확보한 기술들을 유기적으로 연결할 경우 보다 더 우수한 기술이 개발될 수 있는 여지가 많다. 따라서 여건이 조성된다면 추가연구의 필요성은 크다고 생각된다.

2. 타 연구에의 응용

본 연구에서 개발된 *Bacillus* 균 형질전환 시스템, 돌연변이 기술 및 염색체상에서의 효소유전자 증폭기술, 유전자 발현시스템 재구성 등 *Bacillus* 균주 개발을 위한 기반기술과 *B. licheniformis*균, *Bacillus* sp. 79-23균, *B. thuringiensis*균 등을 이용한 효소생산 숙주균 개발 및 효소 고발현시스템 개발 실적은 다른 종류의 유용효소를 비롯하여 고부가가치 유용물질, 의약용 단백질 등의 생산을 위한 균주개발 연구에 널리 적용될 수가 있으며 따라서 그 개발기간을 크게 단축시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 개발된 여러 가지 유전자 재조합 기술등은 그 결과의 활용범위가 매우 넓어서 기술적, 경제적 파급효과가 매우 클 것으로 여겨진다.

3. 기업화 추진방안

가. 본 연구에서 개발한 효소 생산용 균주는 현재 산업적으로 절실히 요청되고 있는 것이며, 개발균주를 참여기업에 제공하여 현장적용시험을 계속하고 있음. 경제성 검토와 더불어 산업적 생산을 준비중임.

나. 일부 계속연구의 필요성이 있는 부분에 대해서는 참여기업과 협의하여 추가 개발을 통해 산업화를 도모해 나갈 계획임.

여　백

제 6 장 참 고 문 헌

1. Tomme, P., Warren, R .A. J., and Gilkes, N. R. (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Phisiol.* 37: 1-81.
2. Winter, G., Fersht, A. R., Wilkinson, A. J., Zoller, M., & Smith, M. (1982) Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding, *Nature* (London) 299, 756-758.
3. Mullis KB, Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
4. Fu A.Y., Spence C., Scherer A., Arnold F. H., Quake S. R. (1999) A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol.* 17:1109-1111.
5. Van Rensburg, P. Van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S. (1998) Engineering yeast for efficient cellulose degradation. *Yeast* 14: 67-76.
6. Fleming, A. B., Tangney, M., Jorgenesen, P. L., Diderichsen, B., and Priest, F. G. (1995) Extracellular enzyme synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis. Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3775-3780.
7. Stragier, P. (1996) Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis. Annu. Rev. Genet.* 30: 297-341.
8. Kunst, F. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis. Nature* 390: 249-256.
9. Bron, S. (1990) Plasmids. *In* Molecular Biological Methods for *Bacillus*, ed. by Harwood, C. R. and Cutting, S. M., John Wiley & Sons Ltd., UK, pp. 75-175.
10. Kallio, P., Palva, A., and Palva, I. (1987) Enhancement of α-amylase production by integrating and amplifying the α-amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 64-71.
11. Tangney, M., Jorgensen, P. L., Diderichsen, B., and Jorgensen, S. T. (1995) A new method for integration and stable DNA amplification in poorly transformable bacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 107-114.
12. Wong H. C., Schnepf H. E., Whiteley H. R., (1983) Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J Biol*

Chem 258(3):1960-1967.

13. Brown K. L., Whiteley H. R.. (1988) Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proc Natl Acad Sci* USA 85(12):4166-4170.
14. Brown K. L., Whiteley H. R.. (1990) Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. *J Bacteriol* 172(12):6682-6688.
15. Agaisse H, Lereclus D. (1996) STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5′ untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol Microbiol* 20(3):633-643.
16. Bron, S. (1990) Plasmids. *In* Molecular Biological Methods for *Bacillus*, ed. by Harwood, C. R. and Cutting, S. M., John Wiley & Sons Ltd., UK, pp. 75-175.
17. Birnboim H. C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6):1513-1523.
18. Chang S., Cohen S. N.. (1979) High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol Gen Genet* 168(1):111-115.
19. Albano, M., J. Hahn, and D. Dubnau. (1987) Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**, 3110-3117.
20.. Bron, S. (1990) Plasmids. *In* Molecular Biological Methods for *Bacillus*, ed. by Harwood, C. R. and Cutting, S. M., John Wiley & Sons Ltd., UK, pp. 75-175.
21. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalisylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
22 Schnepf H. E., Wong H. C., Whiteley H. R. (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J. Biol. Chem.*, 260:6264-6272, 1985
23. Honee G., van der Salm T., Visser B.(1988) Nucleotide sequence of crystal protein gene isolated from *B. thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxin highly active against *Spodoptera* species. *Nucleic Acid Res.*, 16:6240-6240.
24. Koo et al. (1995) Cloning of a novel crystal protein gene *cry1K* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134:159-164.

25. Haima .P, van Sinderen D., Schotting H., Bron S., Venema G. (1990) Development of a beta-galactosidase alpha-complementation system for molecular .cloning in *Bacillus subtilis. Gene,* 86:63-69.

26. Adang M. J. et al. (1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. *Gene* 36(3):289-300.

27. Park S. H., Kim H. K., Pack M. Y.. (1991) Characterization and structure of the cellulase gene of *Bacillus subtilis* BSE616. *Agric. Biol. Chem.*, 55:441-448.

28. Wolf M., Geczi A., Simon O., Borriss R. (1995) Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology* 14:281-290.

29. Yang M., Galizzi A., Henner D. (1983) Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis. Nucleic Acids Res.* 11:237-249.

여　　백

(위탁연구과제)

Bacillus sp. 79-23 분리주를 이용한 효소 생산용 숙주 개발

연구책임자 : 윤 기 홍 (우송대학교 식품생명과학부)
연 구 원 : 김 기 혁 (우송대학교 식품생명과학부)
김 대 원 (우송대학교 식품생명과학부)
신 인 경 (우송대학교 식품생명과학부)
오 영 필 (우송대학교 식품생명과학부)
노 현 주 (우송대학교 식품생명과학부)
이 은 희 (우송대학교 식품생명과학부)
김 소 영 (우송대학교 식품생명과학부)

여 백

I. 서 론

최근들어 면직물 제품의 보습성과 촉감의 유지를 위한 세제로써 뿐만아니라 indigo로 염색된 청바지 직물의 탈색가공 효소로 사용량이 급격히 증대되고 있는 cellulase는 전체 효소시장의 약 15%를 점유하고 있는데 특히 CMCase의 역할이 중요한 것으로 알려져 있다. 종래에 경석을 이용한 청바지 직물의 탈색작업이 기계적 손상이 크고 많은 노동력을 필요로 하는 문제점이 있어 cellulase를 이용한 탈색공정으로 대체되고 있는 것인데 효소로 청바지 직물을 처리할 때 반응 pH가 산성일 경우 indigo의 탈색이 효율적으로 이루어지지 않고 탈색과정 중 재염색이 되어 얼룩이 지는 문제점이 있다. 따라서 청바지 직물이나 면직물의 처리에는 중성이나 알칼리성 pH에서 활성이 높은 cellulase가 사용되어질 필요가 있다.

여러종류 곰팡이와 세균에서 다양한 cellulases가 분리·정제되어 효소적 특성이 밝혀졌으며 그들을 코드하는 유전자들의 염기배열이 결정되어 효소의 1차 구조로 부터 효소간의 활성지역의 분석을 통한 유사성 비교 연구가 되었다 (1, 2, 3). *Trichoderma reesei*와 같은 곰팡이는 대부분이 cellulase를 구성하는 3종류의 효소를 생산하는 것으로 알려져 있으나 (4) 세균의 경우 *Clostridium* 속의 균종 (5)을 제외하고는 cellulase계 효소들을 모두 효과적으로 생산하지 못하지만 CMCase는 보편적으로 생산하며 그 반응특성이 곰팡이 효소보다 다양하여 중성이나 알칼리성 또는 내열성 CMCases들이 발견되었다 (6). 실제 곰팡이는 cellulase 생산성이 매우 높다는 측면에서 장점을 지니고 있으나 cellulase의 구성효소가 모두 생산되어져 면직물의 강도를 저하시킬 위험성이 있을 뿐 아니라 그 대부분이 산성 cellulase이므로 청바지 직물의 탈색공정에 사용되기에 적합하지 않다.

현재까지 연구 진행결과 중의 하나로 중성 CMCase를 생산하는 균주로 토양으로부터 분리된 *Bacillus* sp. 79-23은 다른 *Bacillus* 속 균주에 비해 CMCase 생산성이 높으며 배지 중에 밀기울을 첨가할 경우 CMCase의 생산성이 13배까지 증가하는 것으로 나타났다 (7). Cellulase는 유도형 효소로 배지성분에 의해 그 생합성이 조절되는데 *Thermomonospora fusca*에서는 cellulose와 cellobiose에 의해 CMCase 생합성이 유도되며 (8), *Cellulomonas fimi* (9)와 *Clostridium thermocellum* (10)에서는 cellulase계 각 효소 유전자는 다른 조절기작에 의해 전사되는 것으로 알려져 있다. *C. thermocellum*에서 Avicel 분해효소 생합성이 쉽게 대사되는 탄소원에 의해 억제되는 반면에 CMCase 생합

성은 영향을 받지 않는다. *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*에서는 CMCase가 Avicel, CMC, filter paper에 의해 생산이 유도되고 cellobiose, glucose, xylose에 의해 억제되는 것으로 보고되었다 (11). 그런데 *Bacillus* sp. 79-23에서는 밀기울 뿐아니라 볏짚, CMC, 전분, glucose, lactose 등에 의해서도 효소의 생산성이 증대되는 것으로 밝혀졌다. Glucose와 같이 쉽게 이용되어지는 탄소원이 존재하면 cellulase와 같은 고분자물질의 분해효소의 생합성이 억제되는 catabolite repression이 일어나게 되는데, 79-23 균주에서는 특이하게도 이러한 현상을 보이지 않는 것으로 밝혀졌다.

*Bacillus subtilis*를 비롯한 *Bacillus* 속 균주는 세포외 분비단백질을 생산하는 유전자 재조합 숙주균으로 사용되고 있으며, 이들 균주를 대상으로한 고 생산성 균주의 분자육종이 활발히 수행되어 왔다. 외래 유전자를 발현시켜 목표로 하는 유전자 산물을 대량으로 얻어내는데는 유전자운반체의 불안정성, 숙주균의 단백질분해 활성에 의한 최종산물의 불안정성 등이 큰 문제로 지적되어 왔는데 이를 해결하기 위해 안정성이 높은 plasmid vector, 염색체 유전자증폭 기술, 단백질분해 효소 유전자의 기능이 결여된 숙주균 등이 개발되었다.

특히 숙주균은 단백질분해효소 기능을 상실한 변이주를 개발하여 유전자산물의 안정성을 확보하려는 연구가 초점이 되어 다양한 *B. subtilis*의 변이주 개발과 원래 단백질분해효소 활성이 낮은 *B. brevis*의 탐색이 이루어졌다. 유전자 재조합숙주균의 유전자산물의 생산능력의 한계, 발효시의 오염발생 등의 원인으로 인해 고온성 균주인 *B. licheniformis*는 *B. subtilis*에 비해 많은 장점을 지니고 있으므로 이를 숙주균으로 사용할 만한 가치가 있어 *B. licheniformis*의 분자육종에 대한 관심이 증대되고 있는 형편이다. 한편 본 연구에서 섬유가공용 효소로 사용되는 중성 cellulase를 생산하는 균주로 탐색된 *Bacillus* sp. 79-23은 *B. subtilis*와 그 생화학적 성질이 유사한 것으로 나타났으나 세포표면에 다량의 점질성물질을 생산하고 있다는 점과 기존의 *B. subtilis* 형질전환 조건으로는 외래 유전자의 효과적 도입이 불가능하다는 점이 큰 차이로 밝혀졌다.

대부분의 유전자재조합용 숙주균의 개발이 유전자의 안정성과 효과적 조작의 관점에서 이루어져 온 바를 탈피하여 섬유가공효소의 생산성의 측면에서 볼 때 79-23 균주는 이미 야생형 자체의 효소생산성이 섬유가공용효소 유전자를 증폭시킨 유전자재조합 *B. subtilis* 균주의 효소 생산성 수준과 비견되는 것이 확인 되었으므로 79-23 균주 자체를 섬유가공용 효소 생산을 위한 유전자 재조합용 숙주균으로 개발할 필요가 있으며 이를

대상으로 유전자를 증폭 시킬 경우 섬유가공용 효소의 생산성을 훨씬 개선할 수 있을 것으로 판단된다. 실제 cellulase 생산성 측면에서 곰팡이 cellulase의 생산성에 비해 세균 cellulase 생산성은 매우 낮다는 단점이 있으므로 효소 자체의 반응성이 우수하여도 세균성 cellulase의 생산에는 경제성 문제가 따르게 된다. 그러므로 이미 유전자 재조합 숙주균으로 사용되고 있는 *B. subtilis*를 이용한 효소 생산은 곰팡이를 이용한 효소생산성에 배해 한계를 갖게 되므로 효소 생산성이 우수한 야생형 분리균주 79-23을 cellulase 생산을 위한 유전자 재조합 숙주균으로 개발하는 것은 의미가 크다.

그리고 *Bacillus*에서 생산되는 여러가지 세포외 분비효소의 경우에 그 유전자의 발현이 직접 또는 간접적으로 연계되어 있는 sporulation에 관여하는 조절단백질의 발현을 조절함으로써 목적하는 유용산물의 생산을 직접 향상시키거나 *Bacillus*균의 생리를 변화시켜 간접적으로 생산성을 증가시킬 수 있으므로, 분리균주 79-23이 야생형 균주라는 측면에서 볼 때 유전자 조작기술에 의한 분자육종의 전단계에서 무작위 변이를 통해 79-23의 효소 생산성이 향상될 가능성이 높으며 또한 현재까지는 외래유전자에 의해 형질전환이 이루어지지 않고 있지만 그 원인이 점질성물질에 있으리라 판단되므로 점질성물질의 생산능이 결여된 변이균주를 개발하여 외래 유전자를 이용한 형질전환이 가능할 것이다. 이렇게 개발될 변이숙주균에서 cellulase 유전자를 과잉발현 시킬 수 있는 유전자 발현계의 구축함으로써 효소 생산성을 한층 더 높일 수 있을 것이다. 더구나 분리균 79-23은 고온에서 잘 성장하며 산업용 배지성분의 이용능이 우수하므로 실제 유전자재조합된 79-23 균주의 개발은 섬유가공용 효소 생산에 있어서 경쟁성을 확보할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 *Bacillus* sp. 79-23의 포자를 감마선으로 조사하여 돌연변이를 유도함으로써 CMCase 생산성이 우수하며 점질성물질의 생산능을 상실한 변이주를 개발하여 효소 생산성을 분석하고 이를 유전자 재조합 숙주균으로 사용하기 위해 형질전환법 확립을 수행하였다. 또한 변이 숙주균에 cellulase 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 도입하여 안정하게 유지시키기 위해 *Bacillus* sp. 79-23의 변이균주가 지니고 있는 내재형 플라스미드를 이용하고자 이의 염기서열과 그 기능을 분석하였다.

여 백

II. 재료 및 실험방법

1. 사용균주와 배지

토양에서 분리한 *Bacillus* sp. 79-23 균주와 이를 감마선 조사하여 얻은 7개의 변이주를 cellulase 생산균주로 사용하였으며 *Bacillus* sp. 79-23의 포자를 형성하기 위한 배지로는 HCO배지 (12)가 사용되었으며 cellulase 생산성이 우수한 변이주 선발배지는 LB 평판배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Agar)에 4% Carboxymethylcellulose (CMC; low viscosity, Sigma Co.)와 trypan blue (80㎎/ℓ) 첨가한 배지를 사용하였다. 효소 생산량 조사를 위한 기본배지 LB broth에 부가탄소원으로 첨가한 탄수화물 중 glucose, maltose, lactose와 xylose는 여과멸균한 후 LB broth에 첨가하였으며 볏짚, 밀기울, 전분과 CMC는 LB broth와 함께 첨가하여 가압습식 멸균을 하였다.

2. 돌연변이 유발

포자현탁액 5㎖을 ^{60}Co γ-ray로 조사선량을 달리하여 조사하였다. 감마선 조사 후 포자를 LB 액체배지로 희석하여 LB 평판 배지에 도말하고 37℃에서 하룻밤 배양하여 생균수를 측정하였다. 그리고 효소 생산이 우수한 변이주를 선발하기 위해서는 100~200 colony가 형성되도록 평판배지 에 도말하였다.

3. 효소 활성과 안정성에 영향을 미치는 반응조건 분석

금속이온을 포함한 여러 화합물이 CMCase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 정제된 효소가 사용되었다. 반응액에 조사하고자 하는 화합물을 일정량 첨가한 상태에서 효소반응을 수행한 후 효소활성을 결정하였다. 효소의 열 안정성을 조사하기 위해서는 정제된 소량의 효소를 서로 다른온도에서 일정시간 방치한 후 잔류 효소활성도을 측정하였다.

4. 단백질 분석

단백질의 크기와 정성분석을 위해서 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis (SDS-PAGE)은 10% acrylamide gel를 만들어 사용하였다. Sample buffer (12 mM Tris · HCl buffer (pH 6.8), 5.0% glycerol, 0.4% SDS, 2.8 mM β-mercaptoethanol, 0.2% bromophenol blue)를 효소액과 혼합하여 5분동안 끓인 후 전기영동을 수행하였다. 전기 영동이 끝난 gel을 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue을 포함하는 methanol/H_2O/glacial acetic acid (45:45:10) 용액에서 염색한 후 methanol/glacial acetic acid/H_2O (10:10:80) 용액으로 탈색시켜 염색된 단백질 band를 관찰하였다. 정제된 효소 단백질의 분자량을 측정하기 위해서는 분자량을 알고 있는 표준 단백질과 함께 전기영동함으로써 단백질의 이동도와 분자량과의 관계를 이용하여 분자량을 결정하였다. 단백질을 정량하기 위해서는 Bradford 방법을 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였고 이때 bovine serum albumine을 표준물질로 사용하였다.

5. CMCase 활성측정

Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여 효소반응을 수행한 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다 (13). 증류수에 현탁시킨 1.0% (w/v) CMC 용액 0.5 ㎖와 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 0.25 ㎖를 효소 용액 0.25 ㎖와 혼합하여 40℃에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ㎖를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 glucose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 CMC로 부터 1 μmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

6. 염색체 DNA의 분리

Bacillus sp. 79-23과 그 변이주들로부터 총 염색체 DNA를 분리하기 위해 먼저 신선한 콜로니를 5 ml LB 배지에 접종한 후 37℃에서 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액 1 ml을 취하여 균체를 회수하고 TEN buffer (0.1 M Tris · HCl, 10 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 9.0)로 세척한 후 lysozyme을 함유한 500㎕ SET buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0)에 현탁하였다. 이를 37℃에서 30분 동안 방치한 후 protease K (20 mg/ml) 10㎕를 첨가하고 혼합하였다. Sodium dodecysulfate (SDS)를 최종적으로 1%가

되도록 첨가하고 37℃에서 1시간 방치하여 용균시킨 후 NaCl의 최종농도가 1 M이 되도록 NaCl을 첨가하고 동량의 phenol/chloroform을 처리하였다. 원심분리하여 상등액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 2배 부피의 95% ethanol을 첨가하여 섞고 10분간 실온에서 방치한 후 원심분리하여 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척하였다. 최종적으로 얻은 침전된 DNA를 100㎕ TE buffer (10 mM Tris · HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 현탁하였다.

7. Polymerase chain reaction (PCR)

Bacillus sp. 79-23과 변이주의 *celS* 유전자부위를 증폭하기 위한 primers는 5'-TCGTGCTCATAAGAAGTGTAG-3'와 5'-CAAACCTCCTATTAGATGATAAAAA-3'이며 PCR 반응을 위해 염색체 DNA를 30 ng과 primers를 20 pmole로 첨가하여 최종 반응부피는 20 ㎕가 되도록 하였다. PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 처리한 후 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간 25회 반복반응하여 DNA를 증폭하였다. 반응산물을 분석하기 위해 반응이 종료된 후에 반응액 중 일부를 취하여 agarose gel 전기영동을 수행하고 ethidium bromide에서 염색하여 자외선을 조사한 후 관찰하였다.

여 백

III. 결과 및 고찰

가. *Bacillus* sp. 79-23의 돌연변이주 개발

1. 감마선 조사에 의한 *Bacillus* sp. 79-23의 돌연변이

미생물의 전통적인 돌연변이 방법은 효소 생산균주의 개량을 위해서 오랫동안 사용되어져 왔다 (14, 15). 화학적 변이원, 자외선 및 방사선의 조사는 돌연변이를 유도하기 위해 일반적으로 사용되고 있는데 특히 감마선은 자외선 보다 훨씬 돌연변이를 유도하기에 이로운 장점이 있으나 감마선 조사 시설의 제약 때문에 일반적으로 이용되지는 못하고 있는 실정인데 원자력연구소의 시설을 사용할 경우 안정적으로 돌연변이를 유도할 수 있다.

감마선 조사는 세포 DNA에 여러 유형의 변이를 유발하며 (16, 17) 이러한 변이는 DNA에 직접 에너지를 가한 결과로 일어나거나 DNA 주변에 반응성이 높은 라디칼을 형성하게 함으로써 일어날 수 있다 (18). 감마선을 조사하면 주로 DNA의 변화가 일어나는 것은 아니다. 감마선 조사가 세균의 생존도에 미치는 영향은 각 세균의 생리적 상태와 같은 세포 내적인 요소와 조사되는 균의 밀도에 따라 달라질 수 있다. 그러므로 *Bacillus* sp. 79-23의 변이를 유도하기 위해 우선적으로 포자 현탁액을 제조하여 감마선의 조사선량을 달리하여 조사함으로써 감마선의 조사선량에 따른 생존율을 조사하였다. 조사된 방사선량은 0.5kGy에서 5kGy까지 그 양을 달리하였는데 방사선량을 증가할수록 사멸률이 기하급수적으로 증가하였다 (Fig. 1). 이러한 결과에 기초하여 cellulase 생산성이 우수한 변이주를 개발하기 위해 생존율이 1~5%가 되도록 3kGy~5kGy의 방사선량을 *Basillus* sp. 79-23의 포자 현탁액에 조사하여 *Bacillus* sp. 79-23의 변이를 유도하였다.

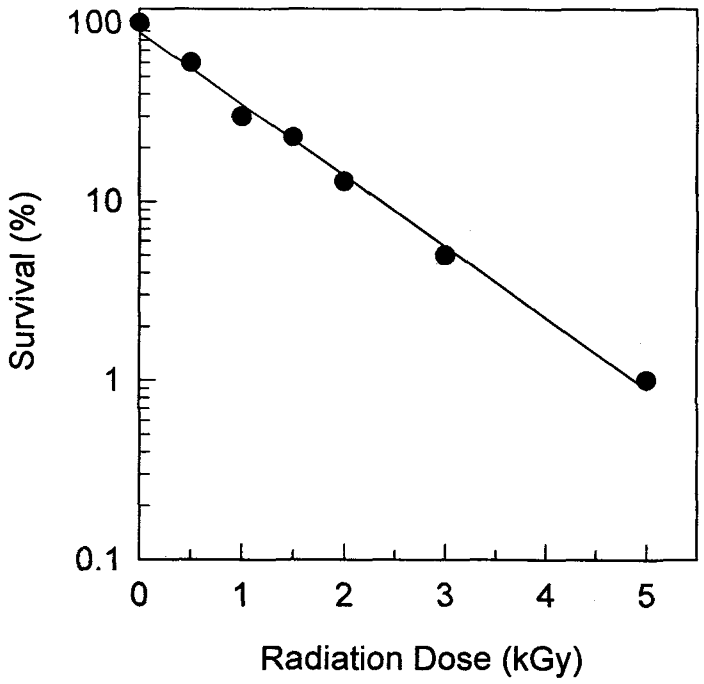


Fig. 1. Survival of *Bacillus* sp. 79-23 spores after gamma-irradiation. The *Bacillus* sp. 79-23 spores (ca. 5×10^{10} CFU/㎖) were irradiated at doses ranging from 0.5 to 5 kGy. The survival (%) was determined by estimating the ratio of the CFU of the irradiated samples to the CFU of a non-irradiated sample.

2. Cellulase 생산성이 우수한 변이주 선발

Cellulase 생산성이 우수한 변이주를 선발하기 위해서 감마선을 조사한 포자 현탁액을 적당한 배수로 희석한 후 CMC와 trypan blue를 첨가한 LB 평판배지에 도말하여 37℃에서 하룻 밤 배양하여 colony 주위에 CMC의 분해환의 크기를 비교하였다. 이때 79-23균주가 이미 CMC 분해능이 높으므로 CMC 분해환의 크기를 비교하여 효소 생산성이 높은 변이주를 선발하는 것은 어려움이 있다. 따라서 모균주의 CMC 분해환과 그 크기를 비교하기에 적당하도록 선별배지에 첨가하는 CMC의 양을 달리하여 분해환의 크기를 조사한 결과 CMC의 농도가 높을수록 분해환의 크기가 작아진다는 사실이 확인 되었고 4% 정

도의 CMC를 첨가한 배지에서는 모균주의 CMC 분해환의 크기가 변이주의 분해환과 비교하기에 적당한 것으로 판단되어 변이주 선발을 위해 4%의 CMC가 첨가된 배지를 이용하였다.

1차적으로 상기의 평판배지에서 약 20만개의 colony로부터 CMC 분해환이 크다고 판단되는 콜로니를 400개 정도를 얻었다. 이들 변이주를 밀기울을 첨가한 LB 액체배지와 첨가하지 않은 LB 액체배지에서 배양하고 배양상등액에 존재하는 cellulase 활성을 측정하였다. 그 결과 7개 변이주가 효소 생산성이 높은 것으로 확인되었고 CMC를 첨가한 평판배지에서도 CMC의 분해환이 모균주에 비해 큰 것으로 나타났다 (Fig. 2).

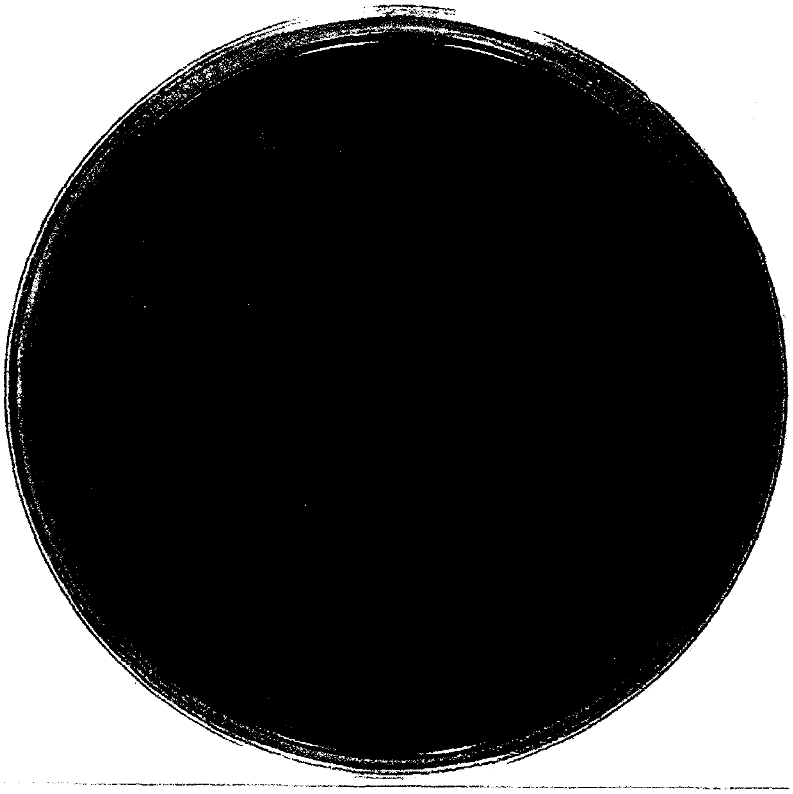


Fig. 2. γ-Radiation-induced mutants of *Bacillus* sp. 79-23 grown on LB medium containing 4% CMC and 0.008% trypan blue. Symbols: M, the parent strain; 4-70, mutant strains.

3. 변이주의 cellulase 생산성에 미치는 부가탄소원의 영향

Bacillus sp. 79-23은 배지 중 부가탄소원에 따라 cellulase 생산성이 달라지며 밀기울을

첨가하였을 때 효소 생산성이 가장 높은 것으로 보고 되었다. Cellulase를 생산하는 대부분의 미생물에서는 glucose와 같이 phophoenolpyruvate 의존성 phosphotransferase system (PTS)의 효소에 의해 인산화된 형태로 세포내로 전달되어 대사되는 PTS 당이 배지내에 존재하면 이를 모두 이용하기 전까지는 cellulase 생합성이 억제되는 것으로 알려져 있다. 그런데 *Bacillus* sp. 79-23은 glucose가 배지에 존재하여도 cellulase의 생산성이 감소되지 않고 오히려 증가되는 것으로 밝혀져 있다. 더구나 *B. subtilis*는 glucose가 PTS에 의해 세포내로 전달되어지며 (19) *Bacillus* sp. 79-23이 *B. subtilis*와 생화학적 성질과 형태가 거의 동일하다는 관점에서 보면 glucose에 의한 cellulase 생산성의 증가는 특이한 현상이라 할 수 있다. 그러므로 *Bacillus* sp. 79-23의 변이주에서 cellulase의 생합성이 탄소원에 의해 어떠한 영향을 받는지 모균주의 것과 비교 분석하기 위해 LB 배지에 서로 다른 부가탄소원을 0.5%씩 첨가하여 37℃에서 14시간 동안 진탕배양한 후 배양 상등액에 존재하는 cellulase 활성을 측정하였다.

Table 1에 보인 것과 같이 모든 변이주는 모균과 같이 부가탄소원이 첨가된 배지에서 cellulase 생산성이 증가한 것으로 확인되었는데 동일배지 조건에서 각 변이주와 모균주 간의 효소 생산성을 비교하면 대개의 경우가 모균주의 효소 생산성보다 약 1.3~1.8배 수준이 높아진 것으로 나타났다. 그러나 변이주 31은 xylose 첨가배지에서, 변이주 46은 lactose 첨가배지에서 각각 모균의 효소생산량과 유사하여 효소생산성이 증가하지 않은 것으로 나타났다. 볏짚의 존재하에서는 변이주 31, 46, 48이 모균주와 유사한 효소생산성을 보였다. 그런데 xylose나 lactose를 첨가한 배지에서는 모균주와 변이주가 모두 배양 후에도 배지 중에 높은 환원당의 값을 보이는 것으로 보아 이를 효율적으로 이용하지 못하는 것을 알 수 있는데 이들의 존재하에서도 cellulase 생산성이 증가되는 현상은 아직까지 의문점이다.

각 변이주별로 부가탄소원을 첨가하지 않은 배지에서와 비교하여 첨가하였을 때 효소 생산성의 증가 양상을 보면 변이주 46이 xylose를 첨가한 배지에서 효소생산성이 예외적으로 높게 증가된 것이 확인되었으나 (Table 2) 다른 탄소원의 첨가에 의해서는 모균주와 비교하여 크게 변화되지 않았다. 그러므로 변이주의 cellulase 생산성의 증가는 이를 코드하는 유전자의 조절부위에서 기인 되었다기 보다는 염색체상에서 비특이적 변이에 의해 일어났거나 cellulase의 구조유전자가 직접 변이되어 효소 비활성이 증가된 때문으로 판단된다. 그러나 변이주 7균주의 효소생산성이 탄소원에 따라 유사하게 영향을 받지

만 효소 생산량은 변이주 마다 차이가 있는 것으로 보아 서로 다른 위치에서 변이가 일어난 것이며 이는 구조유전자 부분이라기 보다는 cellulase 유전자 발현에 간접적인 영향을 미치는 비특이적 변이에 의한 가능성이 높다고 하겠다.

Table 1. Cellulase productivity of parent and mutant strains.

Carbon source	Cellulase productivity (U/mℓ) of strains							
	79-23	4	8	31	46	48	68	70
None	0.171	0.284	0.269	0.239	0.212	0.274	0.288	0.280
CMC	0.207	0.505	0.390	0.410	0.349	0.382	0.526	0.459
Maltose	0.679	1.331	0.908	0.848	0.999	1.115	0.999	1.034
Rice straw	0.818	1.290	1.055	0.863	0.799	0.869	1.343	1.261
Starch	0.612	1.167	0.890	0.816	0.955	0.995	1.008	0.944
Glucose	0.744	1.023	1.164	0.959	1.156	1.276	1.250	1.131
Wheat bran	0.921	1.356	1.260	1.096	1.451	1.112	1.735	1.833
Xylose	0.893	1.144	1.011	0.934	1.745	1.089	1.094	1.047
Lactose	0.797	1.010	1.015	0.930	0.869	1.000	1.086	1.025

Table 2. Relative productivity of parent and mutant strains.

Carbon source	Relative productivity (%) of strains							
	79-23	4	8	31	46	48	68	70
None	100	100	100	100	100	100	100	100
CMC	122	178	145	171	165	139	182	164
Maltose	398	469	337	354	472	406	346	370
Rice straw	480	454	392	361	377	317	466	451
Starch	359	411	330	341	451	363	350	338
Glucose	436	360	432	400	546	465	434	405
Wheat bran	540	478	468	458	685	406	602	656
Xylose	524	403	375	390	824	397	379	374
Lactose	467	356	377	389	411	365	377	367

4. 변이주의 성장과 cellulase 생산성

Table 3을 보면 *B.subtilis* 168과 *B. subtilis* DB104는 밀기울에 큰 영향을 받지 않으나 *Bacillus* sp. 79-23과 그 변이주들은 cellulase 활성이 증가하였다. 68번과 70번의 경우에는 1.5에서 2배정도 증가하는 것으로 보아 효소 생산성은 유전자 재조합 균주에서 얻어지는 효소 생산성과 비교될 정도이므로 매우 우수한 생산균주라 할 수 있다. 또한 이들 균주는 모균주와는 달리 콜로니의 표면이 끈적거리지 않았으며 액체배양시에도 점질성 물질이 생성이 매우 억제되었는데 이는 이들 균주를 유전자 재조합 숙주용 균주로 이용하는데 있어 형질전환시 많은 잇점을 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Cellulase productivity of the mutant strains of *Bacillus* sp. 79-23.

	Cellulase activity (units/mℓ)*	
	LB medium	Wheat bran
B. subtilis 168	0.14	0.3
B. subtilis DB104	0.15	0.3
Bacillus sp. 79-23	0.61	7.6
Mutant strain 4	0.98	13.0
8	0.98	12.9
31	0.86	8.8
46	0.79	15.2
48	1.04	7.1
68	1.10	17.5
70	1.11	15.7

**Bacillus* strains were cultured at 37℃ on LB media either with or without 3% wheat bran. After cultivation for 11 h, the cellulase activities were determined using the culture supernatant.

Fig. 3에 보인바와 같이 변이주 68과 70의 성장과 효소생산성은 LB 배지에서 변이주의 성장과 연계되어 cellulase가 생산되고 밀기울을 첨가한 배지에서는 배양시간이 연장됨에 따라 계속적으로 효소생산량이 증가하여 10시간 정도에 최대 생산성을 보이므로 따라서 다른 5 변이주들에서 효소생산성과 성장과의 관계를 조사하기 위해 각 변이주를 LB 배지와 3% 밀기울을 첨가한 LB 배지에서 플라스크 배양을 행하였다. 배양온도는 37℃로 하여 진탕배양을 하면서 일정한 시간마다 배양액을 일부 취하여 성장도와 배양상등액의 효소활성을 측정하였다. 변이주의 성장도는 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였으므로 LB 배지의 배양액에 대해서만 조사가 가능하였는데 밀기울을 함유한 LB 배지와 이를 함유하지 않은 LB 배지에서 *Bacillus* sp. 79-23의 성장이 유사하다는 보고가 이미 있으므로 LB 배지에서 성장도를 조사하는 것으로 밀기울을 첨가한 배지에서의 미생물의 성장을 예측할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 cellulase 활성은 배양액을 원심분리하여 얻은 배양상등액을 효소액으로 사용하여 측정하였는데 밀기울을 첨가한 배양액에서

는 배양초기에 밀기울에 존재하는 환원당과 낮은 효소활성으로 인해 배양상등액의 효소활성을 측정하는데 어려움이 있었다. 그러나 배양이 3시간 정도 진행된 후에는 효소활성이 높아졌으며 배지중에 존재하는 환원당을 미생물이 이용함으로 인해 환원당이 감소되어 배양상등액에 존재하는 cellulase 활성을 측정하는데 용이하였다.

변이주 48의 경우 성장이 모균주와 비교하였을 때 급격히 저하되어 최종 성장도가 30% 미만이었으며 변이주 8의 경우는 모균주보다 약간 성장도가 높아졌고 나머지 변이주는 모균주와 거의 유사하였다. LB 배지에서 변이주의 cellulase 생산성은 모두 모균주보다 우수하였는데 특히 변이주 48은 성장이 낮음에도 불구하고 효소 생산성이 높은 것으로 확인되었다. 따라서 cellulase 생산성은 변이주 8, 4, 48, 31, 46의 순위로 높았는데 효소생산성이 가장 높은 변이주 8의 경우 LB 배지에서 성장도가 가장 우수했던 것으로 보아 변이주 8에 있어서 cellulase 생산성이 향상된 것은 성장도 증가에 의한 것으로 판단된다. 또한 밀기울을 첨가한 배지에서는 변이주 46, 8, 4, 31의 순서로 높았으며 변이주 48은 모균주와 cellulase 생산성이 유사하였다. 그리고 이들의 성장과 효소 생산성과의 관계를 보면 모균주와 같이 성장과 연계하여 cellulase가 생산되는 것으로 나타났으며 밀기울을 첨가한 배지에서는 첨가하지 않은 배지에 비해 정지기에 이른 후에도 계속적으로 cellulase 생산성이 증가한 것을 알 수 있다. 이러한 현상은 밀기울에 존재하는 성분이나 배양 중 생산된 cellulase에 의해 가수분해된 밀기울 성분에 의해 정지기 후에도 계속적인 효소생산이 일어나는 것으로 생각된다.

변이주는 효소생산성뿐 아니라 점질성 물질의 생산정도와 콜로니의 모양과 크기가 변화 되었는데 이것이 오염균에 의한 것인지를 조사하고, 아울러 변이주의 cellulase를 코드하는 유전자의 크기가 변화하였는지를 간접적으로 분석하기 위해 변이주의 총 유전체를 분리하고 이를 template DNA로 사용하여 PCR을 수행하였다. Primers는 이미 보고된 *Bacillus* sp. 79-23 *celS* 유전자의 염기서열을 참조하여 제작하였는데 구조유전자 개시코돈의 35~55개 염기 앞쪽부분과 종결코돈의 37~62개 염기 뒤쪽부분에 해당하여 PCR 산물은 *celS*의 구조유전자를 모두 포함하게 된다. PCR 산물을 전기영동하여 분석한 모균주인 *Bacillus* sp. 79-23의 유전체 DNA를 template로 사용하여 얻은 PCR 산물과 변이주에서 얻은 것이 모두 동일하였으며 그 크기가 *celS* 유전자에서 예상되는 것과 같이 약 1.6 kb로 확인되었다. 이로보아 모든 변이주는 오염균이 아니고 *Bacillus* sp. 79-23에서 유래된 변이주로 판단되며 변이주의 염색체 상에서 *celS* 유전자의 변이는 삽입이나 결손이

일어난 대규모 변이가 아닌 것으로 추측된다. 물론 agarose gel 전기영동상에서 분석할 수 있는 한계 때문에 작은 크기의 변화는 알 수 없지만 감마선 조사에 의해 변이주의 cellulase 생산성의 증대는 *celS* 유전자내에 소규모 변이이거나 다른 지역의 변이에 의한 것으로 생각된다. 그러므로 이를 밝히기 위해서는 변이주의 *celS* 유전자를 크로닝하여 그 염기서열을 결정하여 모균주의 것과 비교할 필요가 있다고 하겠다.

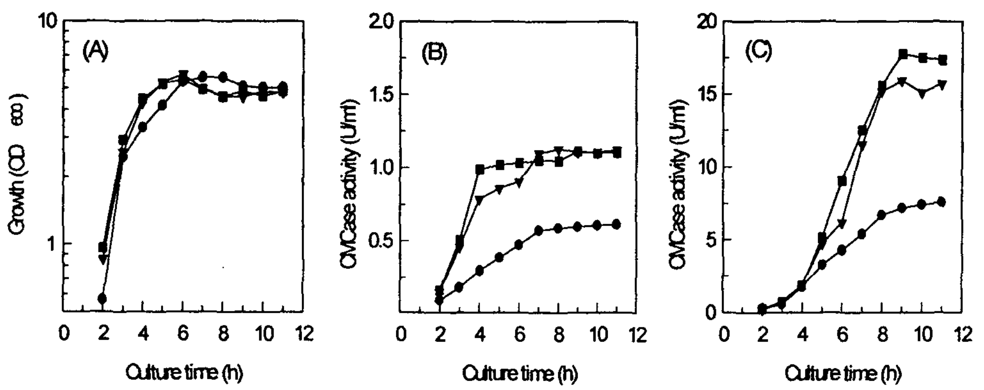


Fig. 3. Growth and CMCase production by the parent and mutant strains in LB medium either with or without 3% wheat bran. (A), Growth on LB medium; (B), CMCase activity in LB medium; (C), CMCase activity in LB medium containing 3% wheat bran. Symbols: ●, parent strain, ▼, mutant 70, ■, mutant 68.

5. 변이주의 포자 형성능

돌연변이 유발이 spore 형성에 얼마나 영향을 주었는지를 조사하기 위해 실험한 결과 변이주 8번과 70번이 모균주 보다 형성정도가 높으며 48번은 spore 형성정도가 매우 낮으며 다른 균주들은 spore 형성정도가 약간 떨어지는 것으로 밝혀졌다 (Table 4).

Table 4. Spore production of parent and mutant strains.

Strain	Spore number (spore/㎖)
Bacillus sp. 79-23	2.3×10^{8}
Mutant strain 4	3.9×10^{7}
8	2.7×10^{8}
31	2.0×10^{8}
46	1.6×10^{8}
48	4.6×10^{2}
68	1.8×10^{8}
70	2.5×10^{8}

나. *Bacillus* sp. 79-23의 변이주의 유전자 재조합

1. *Bacillus* sp. 79-23의 내재형 플라스미드

1) 플라스미드의 염기서열 결정

Bacillus sp. 79-23는 내재형 플라스미드를 지니고 있는 것으로 확인되어 변이주를 유전자 재조합 숙주균으로 사용하여 cellulase 유전자를 안정적으로 도입하기 위해 내재형 플라스미드를 분석하였다. 크기가 약 8.0 kb인 내재형 플라스미드를 pYB1로 명명하였으며, 제한효소 절단 위치가 다른 pYB1을 pUC19에 도입하여 pYB1 전체를 함유한 3 종류의 재조합 플라스미드를 제조하였다.

플라스미드 pYB1의 전체 염기서열을 결정하기 위해 pUC19에 도입된 pYB1을 여러 가지 제한효소로 절단하여 subclones를 제조하고 이를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 그 결과 Fig. 4에 보인바와 같은 플라스미드 pYB1은 7,943 bp로 구성되어 있음이 밝혀졌다.

TTGATACTATATAGAAACACCAAGATTTTTTAAAATCGGTTTAAAGCCTTGCGTGTCAAGGCTTTAAAGTGTTTTTGA
CAGATAAAAACTCCTTCTGCTATTATTAGGGTGTCGAAGCCAAATAATAGAACGCTAGATTACTAGCACAGAAAGG
AGTTTTTTTCGTTTGAATTCAGTTGAACATAATTATAACATCCTTGAGGATAAGACCGCAACAGGTAAAAAGCGGGA
TTGGAAAGGGAAAAAGAGACGGACGAATCTTATGGCAGAGCACTATGAAGCTTTACAGAGCAAAACTGGTATACC
TTACTATGGCAAAAAAGCTGAGAAATTGTGCAGTTGTGCGGAATGTCTTTCGTTTAAAAGAGACCCGGAGACGGG
CAAACTAAAGTTGTATCAAGCTCAGTTTTGCAAAGTGAGGTTATGCCCGATGTGTGCCTGGCGCAGGTCGTTAAAA
ATTGCTTATCACAATAAATTGATCGTAGAAGAAGCTAATCGTCAGTATGGATGCGGATGGATTTTTCTCACGTTGAC
CGTTCGAAATGTTAAAGGTGACAGTCTGAAACCTTCGATTTCGGACATGATGAAAGGGTTTAATCGACTTATGAAAT
ACAAAAGGGTCGATACAGCGGTACTTGGCTATTTTAGAGCTTTAGAGATTACTAAAAATCATGAAGAAGATACATAT
CATCCGCATTTTCATGTGTTATTGCCTGTGAAGAAAAGTTATTTCGGCAAAAATTATATCAAGCAGACGGAATGGAC
AAGCCTTTGGAAAAAGGCGATGAAATTGGATTACACCCCAATTGTTGATATTCGTCGGGTGAAAGGTAAAGCCAAG
ATTGACGCTGAACAGATTGAAAACGACGTGCGGGAAGCGATGATGGAGCAAAAAGCTGTTCTTGAAATCTCTAAG
TATCCAGTCAAGGATACGGATGTTGTGCGTGGCAATAAGGTGACAGAAGACAATCTGAACACGGTGTTTTATTTGG
ATGATGCACTGGCTGCCCGTAGATTAATAGGGTACGGCGGCATTTTAAAAGAGATACATAAAGAGCTGAACCTTG
GAGATGCGGAGGACGGCGATCTGGTCAAGATTGAGGAAGAAGATGACGAGGTTGCAAATGGAGCGTTTGAGGTC
ATGGCTTATTGGCATCCTGGTATTAAAAATTACATAATCAAACAATAAGGAAACAGAAGGTTTCCTTATTGTTTTGAA
GTTTTAATTTTCCTTAAAACATTAAATTTAATATATTTCCTTTCTAAATTATGATAATATTTCCTATGGATCAAATGGGA
AATAATGTTTGTTTCAAGATTTAGTAGGATGAATTTTTGTGAAGAAGATAGTATTTATCATGACTACTTTGATTTTAGT
ATTTTCATTATCTCCGTATTCGGGAAATGGAAATGTAGCTGTGGCTGAAGAAAAGACTAGTGATGAAAAAATTGTTA
ATGAAGCAAATGATATAGCTGAAAAATATGGTTTTGAAACTGTACCTGAAGAAAAAATTTCTACGAAAAATACATTAA
ATTTTAATTCGGTTGAGGAATTTGAAAAGTTTCTCAAAGAAGAAAGTGCTAAAGATAAGGCATTAAACGCGGATAAA
AATGTTGTTAAAGAAGTTTCCGAAAATCCTGTTATGTTTTTGGCTGCTTCTAAGGCTAAAACAACAACTAAAACTTAT
AGCTATAAAGAGTACAATGGTACAGGATATATTGGTTCATATGCTCGTGTTAAAAGAACAGGTGGAAAAGTTAAAAG
TGTAAATGTATGGAGTGAACAAAACGGTTTTATCTTTGGTATTACTTGGACACAGCGTACAACATGGTATAATTTAA
ATGCAAAGAAAACTGGTGGTAAAGCTTATGTAAGAGGAACAAAGCTATACGGCATGAATGTAGTTGGCCAACCAGT
TGGATATTCAAAGTCAGTGACTTATACTGTGAAGTTCTAAAAAGGAGGGTTTCCTTTGACTGAAGTATCGACTATAA
ACTGGTTTGATGTGATTTATAATTATTCAGTGCTTGGAGCTTCAATTCTTCTTGTATTTTTCATTGTGAAGATTGTGA
AGAAAAGAAGAGCTAAAAAGCGTCAACAATTCAATTAAGAAAAGAGCAGACCTTTAAAGGTCTGCTTTTTTACATGG
CGGCATTTTAAAAGAGATACATAAAGAGCTGAATCTTGGTGATGCGGAGGACGGCGATCTTGTTAAGATTGAGGA
AGAAGATGACGAGGTTGCGAATGGTGCATTTGAGGTCATGGCTTACTGGCATCCAGGCATTAAGAATTACATAATC
AAATAGACAAGCAGATTCCCTTGTGGAATCTGCTATTTTTGTTGCTTTCTTTTCAGTGTGTCCTCGATTTCTCCCCA
TATTAGATAAACTAAACCCAAAATAAATAGTGCAATGCTTATTTGAAGCGCCCAGGGCATATTTTCATTGGCTTGCC
TTTCTAGGGTTCCATGTCCTTGAAAGGCAATGGTCATTAAACCCATGTTTAGGTATTTCAGAGTATGTATAAGTGCC
GCAGTTGAAATAAAAATGGCTCCTGTTATTCTTCTTGTCACTGTTTTCCCTCCTATATGGGCCCGTATATATAATAC
CTCTTATTAGGATTTTTTTGTTATATTTTGAATTGAATTAAGAGAAAATTAAGAAGGGTATGAATTATAGTGAAATTAC
TGATGAGTTTTGTGTTTGGAGCTTTAGGTGCATTATTAATGGTAAGTGTGAGAGAAAATTTTTCTTTTACCGTTACAT
TAATTGTTTTAGTTGTTGTTATCATCGTTGCTTTTATTCTTGATGAGTTATGGAAAAGGCATAAAAAAAGAGAGAAGA
AGATTAATCTTCTTCTCTCTTTTTTTATGCCTTTGTCCTCTATGGGGTTCCGTCAGGAAAATGCGGATTTACAACGTT
AAACTATTTTTGGGAAACAAAAACCTGCTTCTCCAACTCTAAGCAGAAGAAGCAAGGTGAGGTAATATTTTCACTTG
CCAGAATCACGAGGTGGATTCACCATAAGAAACACTCTAAAAATTGGTACAGATACGAATCCATTTGTACAGAACG
TAAAGTAAAGGATTTATGAATAAACGTATACAAAATTGGAATAATATCTTTGAAAATAACCAAGGAGGATTGAATATG
TCATTAGTACCTTATGATCCATTTAGACAATTATCAAATATGAGAAGAGAATTCGATCGTTTCTTTTCGGAATTACCA
ATTTCGTTTGACAATGAACATGGTATAGGTGGGATTCGAGTTGATGTTCATGAAACTGAGAATGAGGTTGTGGCAA
CATGTGATTTACCTGGTCTTGAAAAGAAAGAAGATGTAGATATTGATATACAAAATAACAGATTAAGCATTAGTGGT
TCTATCAAGCGTACCAATGAAATAAAAGAAGAAAATATGTTAAAAAAGGAACGCTATACAGGTCGTTTTCAACGTAT
GATAACACTTCCAAGCCCCGTTTCACATGATGGGGTTAAAGCTACGTACAAAAATGGAATACTTGAAATAACAATG
CCAAAAGTGGCGAAGGACGTAAAAAAGAAGATAGATGTAAGTTTCCAGTAACATGAGTAAATTGCTACTGGTCATG
AAAGATTTCGGGTATGACTACATGCAGGAATTAGCTAAAGAAAGTCCTGATTTGGTGGATTTGATAATTTTAACTAT
TCATTCACCTGAACAACAAAAGAAAAAGGTCATTTCTGAGTTAACAGATAATATTAAGAAAAGCTTTTTATAAATCTG
ATAAGGATCATAGGCTTTATATAAGCTAATAAATAATCATTATAGTACCTAAATTGTAATTAATTCATCGAAAGAGAAA
GACAGGTTAAATAACTTGTCTTTTTTGTTTTGCAATTAACAAAAGATTATTTGGTCAATCTTTGTAATAACATGTTTAC
TATAACCAACATAAATAATTATGAATAACAATACCATAATTTTGTAATGCTAACTGTAAACTAACATTGTGAGAGGAT
ATTATGTACATAAAGGGGTACCGTCAGGAAAATAGGCTTAGCGTTGTAAATCCGCATTTTCCTGACGGTGTACCTC
TATGGGGAAGATCCTTATAAAATGAGAAAGTAGATGCACGGTTTCACAGCATACTTTCTTTGATTGAAAATTTGACA
CATAGAACAATTTGTTCATGTGTCAAATGCTGTGGAAGCAGCAAGGGTTTTTCTGATTTTCTGCCGATCTCTCATCG

GCGGAAAAATCGGGTCGGCGGACAGCCGACAAGTGGCACGAACTTTCGATGCGATAGCGAGAATGAGAGAGCC
ACCAGCACCGCAGGTCGCACGTCCAAATTTGCCATGGGCATAATTTGGTGTAGTGCGTTACACCAAAGATAAACTT
TGTGTTACCATAACCCCTATACAGTGGTCTGAATCGGGGGTTTTTCTCATGGCAAATTATGCGGTCATAAGGATGG
AAAAATACAAAAAAGATAGATTGAATGGAACACAAAAACACAATCAGCGGGAGTTTCAAAAAAGCAAAAATGAAAAT
ATAGATCGGGAGCGGACGCACTTAAATTATGATCTGGTGAACGAGAAACCGATTAGCTATTCAAAAGCGGTTCATG
AAAAAATTGAGGGGCGGGTCAAACGGAAGGTCCGAGCGGATGCTGTCTTGGTCAGCGAATTTTTGATCACGGCA
AGTCCTGACTATATGAATGGGATGAGCGAGAAGGAGCAGCGGCGCTATTTTGAAACAGCGGTTGATCATTTGAAA
GAGAAATACAGCGCTGAAAACATGCTTTATGCCACAGTCCATATGGATGAAGCGACTCCTCATATGCATGTTGGTA
TTGTACCGATCACGGAGGACGGTCGACTCTCTGCGAAAGATTTTTTTAATGGCAAATTGAAGATGAAAGCCATTCA
AGATGATTTTCATCGGCACATGGTTGAAAACGGTTTTGACCTGGTACGCGGCGAACCAAGCGAAAAGAAGCATGA
GAATGTTCACCAGTATAAAATAAATCAGCGGAAAGCGGAGCTTGAGCGGCTTAATGCTGAAATTGCTTTAAAGGAA
AAGCAGAGAGAGGAACTGGAAAAGCAAAACAAAGCTGTTCAAGCAGTTATAGAAGTGAAAAAAGAATCGCTGACA
GTTAAGGCTGAAGAGTTGAAAATGCCGACTATTGAACATGAAAAAGCGTGGCTCAAAAAGGATAAAGTCATTGTGC
CGGAGCGGGAACTTCATGCTTTGTACGCCTATGCGGAGCAGAAAACTAAAATAGCAGCCGAGTTGGCGGGGCAA
TTGAAGTCGGAAACGAAGGAAAAGGAGCGCTGGCAGTCTATCGCCCGGCAGGAAGCAGATCGGGCGGATGAAA
AAGACCAACGGCTTCAGGAACTGCAGAGTAGGATCCATTCGGAAGTTGAAGCGTCCAAAAAGGAGATGCGGCGC
AAGCTTGCAAAGGAATTTACGGAAGAACAGCGTCAGGATCTTCGGCAGGAAGTGAAAGAGGAACTGACGACTTTA
CGAACGGAAAACGAGGAACTGTCAGCTGAAAATAAAGTTTTGATCATTCAAAGAAATAGCGAAGCTGCGGAGAGC
CTAAAACTAAAACAGGAACTTGATAAGAGAAACGGGCAGTATGCTGAGGTTTTGAGTTTCGCCAAGAAGCAGAATC
AAACGCTTGAAAAAGTGGTTGGAGAAAACAAGGTGTTAAAAAAAGAAAATAAGACACTAAAAGAGAGAGTTGCCGT
ACTGGAACAATGGAAAGACAAAATGGTTCAGTGGGCTAAAGAAAAATTACCAAAGATGCGGAAATTAGCGGCATC
GTTTTTCCGTACGGCTGGAATGCCTAGAGAAGCCAATAAATACAAGGACAATGAATTAGAGCGGTGACTGTTGTG
GCAATCAGTTGCCTTTCCAAAATTCCCACCACTTTTTTTGTTTGGTGGCTGCGATCATTTTTTGTGTCTCCAGTGAT
TCTCGTAAAGCTTTTGTAAGAAGGTCATGTCTTTCGCTCTGTCTTCTTTCGAAAGCTTCCATCCGTTCCATCATGCT
GTGGTTAAATTCTTCTTGTCGCTTCATAAATTCGATCAATGGATTGTCCTGTAGCGATGTAGCGGTATTCGATATGG
ACAGTTTTGAACGATACAGGCTTGCTATATGCTTTACCGTTTCGTCGAGTGAGTGTCCATTGATTTTAGTCATTGTA
CATAGATACTCTAAAGTCTTTACGTCATCCTCGGTATAGAGTCGCCATCCTTTTGAGTCCTTATTGAATGAGTACCC
TTGTTCTTCAAGCATACTTGCATACTTGCGGACGGTCACAGGCTCTATACCGAGATGTTTTGCGACGTCTTTTGAC
GATAATTTAACTCCCATATCCATCACGAATCACCCCTTAAAAAGGGTTCGCTATAGCGATACTAAAGACCTTTAAGT
GCTGCACCCTTTATTTGAGTTGTTTTGTAAAAGGGTGCAATTGAAAAGGAGCGCTGCGTACCTAAATGAATTGAGA
AATACAGTTATATCAAGGGATGAGAAGGATTTAAATTAAGTTTGAGTTTGTTTCGGAATTTAGGAGCTGATTATACG
CACCAAATTTTTGGAGCGGTTCATGACAAACTCCTGCAGGGGCTTTTAATAAAAAAAGAGGTGTGTAGTAATGCAA
GAGATTGATTTTGAAACAAGGATGAGATATGTAAGAGCAACCCTTGGCTTTGAGGGTTTAGTGCTGACGGAAGCA
GAGGAAAAGCTTTTAGAAAGACGGTTTCATGGAGAAATCACAGAGGAAGAATACATACAAAAAGCGTTTGAGCTTT
CTTTGATGTGAAGTGGTCACTATTGAAGTGCCCAGTTATACGCACCAAATAAATTGGGGCGTTACTGGCGGAATGT
ACCTGCAGGGGCTTATAATATTCATAGTTGTTGTTAGAACCTGAACCCTTTTACCGTTTTTGGCGGTGAGGGTTCTT
TTTTTTAGGCAGTGATGCGAGTTGGGGGTGAGTCAACGGTAACCGGACCGTAGGGAGGATTAAGGAGTTGACTC
GCTCAGCGCCACCCGAACCCTTTCAGCACTCAAACAAACCCGTTTGTTTGACGCCAACCGGCGAGGGAGCCCCC
CGAAGATGCGGGGGGTTGGGGGGATTGAATGCTGGCATCCAACGGCCGTCCGTTGGTGGGTTTGGGCAAAGCC
CAAGAACTGTTGCAAGGCTCGTTGAGAATAAAGAATGCTTTTCAGGATGCTTAGAATCGTTTCTGAGAGCTTCAAA
TAAAAAAGATGACCTTTTATAGGGGGAAGCTCTTAAAATTGAATGTAGGGGCATTTAAACACGTTTAAAAATAAAAA
AAGCAGACTCTTTAGAGTCCGCCTTGTTATTTTTAACCCAGTGCTCCATTTTATAAGCGTAAAGCTGTCGTAAGAAT
GTTAGATGAATTGATAGAGAAAAGATATTTTCTCCAATTTAAAAAAAGAGACGGCAAGAAAGATACTTATAAATACAT
ATATAGACATAGTTCCTTTTCTGATGACGAAATTATAGAGTTGAAAAAGATTCTTAGTGATCATCATTTTGTAATGTT
GGGTGATACACAAGAATCAAATTTGGGGACTGGGAAACGAACATCCCAAGAAACGCCGTCAAATCAAGGTTTATT
GGACTGTTCGTTTTCAGGTGTCCAAAATCAGGTGTCCATTTTCGAGTGTTCAAATCCAAGTAGTAATAGAATACACA
TGGAAGATAATACACATATAAATAATACACATATAGATAATACACAATCTTTAGATTCTTTTTCTTTGGACGATGATG
ACGAAAAAAAAATATATATAGAGTTGAAAAAAATCTCCCCCCTGGAAGAATGGTTTTGATCTTTGGGTTTTAGGTTTTA
AAAAAGCCGGCTGTTTTCAGCCGGCTTTTTTTCGATTTTGGCGGAGCCGAAATCGGGTCTTTTCTTATC

Fig. 4. Complete nucleotide sequence of a *Bacillus sp.* plasmid pYB1

2) 플라스미드 pYB1의 기능분석

플라스미드 pYB1의 염기서열을 이용하여 ORF를 분석한 결과 15개의 ORF가 발견되었으며, 각 ORFs의 아미노산 배열들은 기존에 알려진 단백질의 database와 비교한 결과 mobilization protein (Mob), replication protein (Rep), Stress response homlog (Hsp), DNA binding protein (Ptr)으로 예상되는 4 ORFs가 확인되었다 (Table 5). 플라스미드 pYB1의 제한효소지도와 orfs를 Fig. 5에 나타내었다.

Table 5. Characterization of the ORFs function of plasmid pYB1

Orfs	Location	Size (a.a)	Function
orf1	167-1189F	340	Rep
orf2	1338-1958F	206	Unknown
orf3	1974-2111F	45	Unknown
orf4	2343-2572R	79	Unknown
orf5	2669-2809F	46	Unknown
orf6	2682-2996F	95	Unknown
orf7	3151-3588F	145	Hsp
orf8	4008-4100F	30	Unknown
orf9	4432-5880F	482	Mob
orf10	4607-4985R	129	Unknown
orf11	5038-5399R	114	Unknown
orf12	5892-6371R	159	Ptr
orf13	6650-6806F	55	Unknown
orf14	7207-7278F	83	Unknown
orf15	7409-7816F	135	Unknown

Rep : Replication initiator protein.
Hsp : Stress response homlog.
Mob : Mobilization Protein.
Ptr : DNA binding protein Ptr.
F; On top strand, R; On the bottom strand.

내재형 Plasmid DNA pYB1

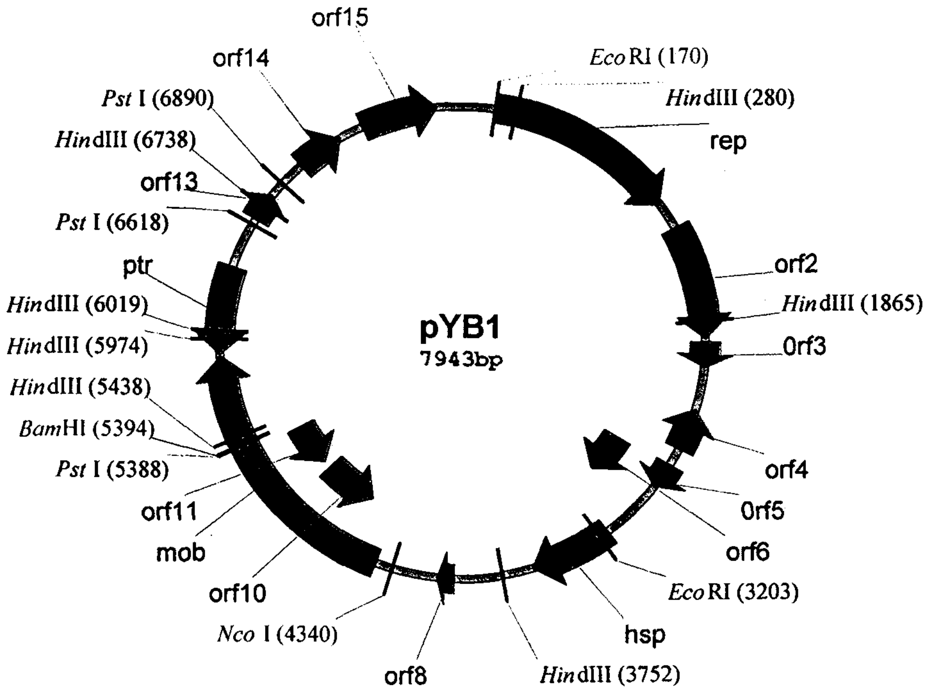


Fig. 5. Physical map of pYB1 and localization of fifteen *orf*s

2. *Bacillus* sp. 79-23의 변이주의 유전자 조작

Bacillus sp. 79-29의 변이주로 효소 생산성이 높은 68번을 nitrosoguanidine으로 재변이를 하여 얻은 20번 변이주를 숙주균으로 하여 형질전환을 수행하였다. 형질전환 방법은 기존의 *B. subtilis*에 사용되는 방법을 응용하였으며, 사용된 플라스미드는 pHPS9이다. 기존의 competent 방법에 의해서는 변이주 20번이 전혀 형질전환되지 않는 것으로 확인되어 electroporation 방법을 사용하였으며, 형질전환빈도는 *B. subtilis*에 비해 낮지만 변이주 20번의 형질전환주를 얻었다.

또한 변이주 20번에 cellulase 유전자의 도입시 내재형 플라스미드의 복제와 유지에 영향을 미치지 않도록 하기 위해 변이주의 내재형 플라스미드에 *in vivo* 상동성 재조합에 의해 cellulase 유전자가 삽입될 수 있는 삽입용 유전자 운반체에 cellulase 유전자를 도입한 재조합 플라스미드를 제조하였다.

여 백

IV. 결 론

1. *Bacillus* sp. 79-23의 포자를 감마선으로 조사하여 얻은 7개 변이주의 cellulase 생산성에 미치는 탄소원의 영향을 모균주와 비교 분석하였다. LB 배지에 부가탄소원으로 glucose, xylose, maltose, lactose, CMC, starch, 볏짚, 밀기울을 첨가하여 배양한 후 배양상등액에 존재하는 cellulase의 활성을 측정한 결과 변이주의 효소생산성은 탄소원에 의해 모균주와 유사한 영향을 받는 것으로 나타났으나 변이주에 따라 약간의 차이는 존재하였다. 특히 xylose와 볏짚에 의한 변이주들의 효소생산량간에 차이가 나타났다. 대부분 변이주의 성장정도도 모 균주와 유사한 것으로 확인되었으며 효소는성장과 연계되어 생산되었다.
2. Cellulase를 코드하는 유전자를 포함한 부위가 모든 변이주와 모균주의 총 유전체 DNA로부터 동일한 primers로 증폭되었으며 그 크기가 전기영동상에서 동일한 것으로 확인되었다.
3. 변이주 68번과 70번은 세포 성장도는 모균과 동일하였으나 점질성 물질의 생산이 모균에 비해 현저하게 감소했다. 최종 선발된 변이주들의 flask 배양을 통하여 정량적으로 효소 활성을 측정한 결과 변이주 68번과 70번이 높은 활성을 보였고 *Bacillus* sp. 79-23 균주보다 cellulase 생산성이 2배가 증가하였으며 특히 68번과 70번을 밀기울이 첨가된 LB 배지에서 11시간 동안 flask 배양을 했을 때 17.8 unit/㎖와 15.7 unit/㎖의 매우 높은 cellulase 활성을 보여 기존에 재조합 숙주균으로 많이 사용되어지고 있는 *B. subtilis* 168과 *B. subtilis* DB104 균주보다 cellulase 생산성이 약 50배가 증가되었다.
4. *Bacillus* sp. 79-23의 내재형 플라스미드 pYB1을 분리하여 전체 7,923 bp의 염기서열을 결정하였으며, ORF를 분석한 결과 15개의 ORFs가 확인되었다. 이들 중 4 개의 ORFs의 기능이 mobilization protein, replication protein, stress response homlog, DNA binding protein으로 확인되었다.
5. 변이주 68번의 NTG로 재 변이하여 생산성이 더욱 증가한 변이주 20번을 얻어 이를 유전자 재조합 숙주균으로 사용할 수 있는지를 결정하기 위해 형질전환을 시도한 결과 플라스미드 pHPS9을 사용하여 형질전환주를 얻었다.
6. 변이주 20번의 형질전환 조건과 내재형 플라스미드 분석을 완료하였으므로 cellulase를

과잉 생산하는 유전자 재조합 변이주를 개발하기 위해 내재형 플라스미드 pYB1에 in vivo에서 재조합 할 수 있고 cellulase 유전자가 도입된 삽입용 재조합 플라스미드를 제조하였다.

V. 참고문헌

1. Gilkes, N.R., B. Henrissat, D.G. Kilburn, R.C. Miller, Jr., and R.A.J. Warren (1991), "Domains in microbial β-1,4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families" , *Microbiol. Rev.,* 55: 303-315.
2. Sunna, A. and G. Antranikian (1997), "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria" , *Crit. Rev. Biotechnol.,* 17: 39-67.
3. Tomme, P., R.A.J. Warren, and N.R. Gilkes (1995), "Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi" , *Adv. Microb. Physiol.,* 37: 1-81.
4. Watson, T.G., I. Neligan, and L. Lessing (1984), "Cellulase production by *Trichoderma reesei* (Rut C-30) in fed-batch culture" , *Biotechnol. Lett.*, 6: 667-672.
5. Belaich, J.P., C. Tardif, A. Belaich, and C.J. Gaudin (1997), "The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*" , *J. Biotechnol.*, 57: 3-14.
6. Béguin, P. (1990), "Molecular biology of cellulose degradation" , *Annu. Rev. Microbiol.,* 44: 219-248.
7. Yoon, K.-H., K.H. Jung, and S.-H. Park (1997), "Isolation and enzyme production of a cellulase-producing *Bacillus* sp. 79-23" , *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 546-551.
8. Lin, E. and D.B. Wilson (1987), "Regulation of β-1,4-endoglucanase synthesis in *Thermomonospora fusca*" , *Appl. Environ. Microbiol.,* 53: 1352-1357.
9. Greenberg, N.M., R.A.J. Warren, D.G. Kilburn, and R.C. Miller, Jr. (1987), "Regulation and initiation of *cenB* transcripts of *Cellulomonas fimi*" , *J. Bacteriol.,* 169: 4674-4677.
10. Johnson, E.A., F. Bouchot, and A.L. Demain (1985), "Regulation of cellulase formation in *Clostridium thermocellum*" , *J. Gen. Microbiol.,* 131: 2303-2308.
11. Hazlewood, G.P., J.I. Laurie, L.M. Ferreira, and H.J. Gilbert (1992), "*Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*: an alternative model for bacterial cellulase" , *J. Appl. Bacteriol.,* 72: 244-251.

12. Lecadet, M.-M., M.-O. Blondel, and J. Ribier (1980), "Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP-54 Ber" , *J. Gen. Microbiol.* 121: 203-212.

13. Miller, G.L., R. Blum. W.E. Glennon, and A.L. Burton (1960), "Measurement of carboxymethylcellulase activity" , *Anal. Biochem.*, 2: 127-132.

14. Aho, S., A. Arffman, and M. Korhola (1996), "*Saccharomyces cerevisiae* mutants selected for increased production of *Trichoderma reesei* cellulases" , *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 36-45.

15. Kuhad, R. C., M. Kumar, and A. Singh (1994), "A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*" , *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 397-400.

16. Halliwell, B. and O. I. Aruoma (1991), "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian cells" , *FEBS Lett.*. 281: 9-19.

17. von Sonntag, C. (1987), "*The chemical basis of radiation biology*" , Taylor & Francis, New York.

18. Michaels, H. B. and J. W. Hunt (1978), "A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach" , *Rad. Res.* 74: 23-34.

19. Gonzy-Treboul, G. and M. Steinmetz (1987), "Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: cloning of the region containing the *ptsH* and *ptsI* genes and evidence for a *crr*-like gene" , *J. Bacteriol.*, 169: 2287-2290.

편집순서 9

<table>
<tr><th colspan="6">특정연구개발사업 연구결과 활용계획서</th></tr>
<tr><td rowspan="2">사업명</td><td>중사업명</td><td colspan="4">선도기술개발사업</td></tr>
<tr><td>세부사업명</td><td colspan="4">신기능생물소재 기술개발사업</td></tr>
<tr><td colspan="2">과제명</td><td colspan="4">섬유가공용 효소 생산을 위한 Bacillus 균주의 분자육종과 공업적 응용</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구기관</td><td colspan="2">한국생명공학연구원</td><td>연구책임자</td><td>박승환</td></tr>
<tr><td colspan="2">총연구기간</td><td colspan="4">1994년 9월 1일 ~ 2002년 8월 31일 (8년 개월)</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">총 연구비
(단위 : 천원)</td><td colspan="2">정부출연금</td><td>민간부담금</td><td>합계</td></tr>
<tr><td colspan="2">1,100,424</td><td>345,000</td><td>1,445,424</td></tr>
<tr><td colspan="2">기술분야</td><td colspan="4">410, 413</td></tr>
<tr><td colspan="2">참여기업</td><td colspan="4">(주) 제노포커스, (주) 상우화학</td></tr>
<tr><td colspan="2">공동연구기관</td><td colspan="4">(주)제노포커스부설연구소</td></tr>
<tr><td colspan="2">위탁연구기관</td><td colspan="4">우송대학교</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">연구결과활용
(해당항목에(∨)
표시)</td><td>1. 기업화( )</td><td>2. 기술이전(∨)</td><td>3. 후속연구추진( )</td><td>4.타사업에 활용( )</td></tr>
<tr><td>5. 선행 및 기초연구( )</td><td>6. 기타목적활용 (교육,연구)( )</td><td>7. 활용중단(미활용)( )</td><td>8. 기타( )</td></tr>
</table>

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
　　　2. 기술요약서 1부

2002년 10 월 일

연구책임자 : 박 승 환 (인)
연구기관장 : 양 규 환 (직인)

과학기술부장관 귀하

여　　　백

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

※ 당초 연구계획서상의 목표 및 내용을 간략히 기술(300자이내)

청바지 염료 indigo의 탈색공정과 면직물의 고품질화를 위한 polishing 공정 등 섬유가공산업에 내열성 α-amylase와 중성 cellulase의 유용성이 증대되고 있으나 이들 효소를 효율적으로 생산할 수 있는 산업용 균주를 구하기 어려운 현실을 타개하고자 효소 고생산성 *Bacillus* 균주를 개발하여 산업화하고 나아가 이들 기술을 다른 산업용 효소 생산에 확산시키고자 하는 것이 본 과제의 목적이다. 본 연구에서는 반응 특성이 우수한 섬유가공용 효소 유전자원을 확보하고 이들 효소를 산업적으로 생산할 수 있는 *Bacillus* 균주를 개발하고자 하였으며 다음의 세부 목표를 설정하였다; ①유용 효소 고발현을 위한 분비발현계 개발, ②산업용 효소의 생산을 위한 *Bacillus*숙주균 개발, ③cellulase와 α-amylase 고생산성 *Bacillus*균주 개발, ④개발균주를 이용한 생산공정 최적화 및 산업화

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
포자형성 의존성 프로모터를 이용한 목적 단백질의 생산방법	출원번호 2000-77183	2000. 12. 15	박승환 반재구 신병식 최수근	한국	
중성 셀룰라아제를 생산하는 신규한 바실러스 속 79-23 균주	등록 번호 제 0318554 호	2001. 12. 11	박승환 신병식 윤기홍 정경화 최수근	한국	

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

ㅇ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국 명	SCI게재 여부
JOURNAL OF GENERAL AND APPLIED MICROBIOLOGY	Integration and amplification of the *Bacillus* sp. 79-23 cellulase gene in the *Bacillus subtilis* 168 chromosome	1998년	44: 107-111		일본	O
JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	Molecular cloning and the nucleotide sequence of a *Bacillus* sp. KK-1 β-xylosidase gene	1998년	8: 28-33		한국	O
BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL	Cloning and expression of a *Clostridium thermocellum* xylanase gene in *Escherichia coli*	1998년	44: 283-292		호주	O
JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	Purification and characterization of the *Bacillus* sp. KK-1 beta-xylosidase from a recombinant *Escherichia coli*	1998년	8: 258-263		한국	O
ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY	Expression of CMCase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein	1998년	22: 348-354		유럽	O
JOURNAL OF KOREAN SOCIETY OF AGR. CHEM. BIOTEC.	alpha-Amylase 고생산성 *Bacillus licheniforis* 변이주의 개발과 특성 분석	1998년	41: 18-22		한국	X
JOURNAL OF BIOCHEMISTRY	Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene	1999년	126: 333-339		일본	O
JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	Hyper-CMCase-producing mutants of *Bacillus* sp. 79-23 induced by gamma-radiation	1999년	9: 518-521		한국	O

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국 명	SCI게재 여부
JOURNAL OF BACTERIOLOGY	Analysis of *tnrA* alleles which result in a glucose-resistant sporulation phenotype in *Bacillus subtilis*	2000년	182:5009 - 5012	ASM	미국	O
FEMS MICROBIOLOGY LETTERS	Involvement of acetyl phosphate in the in vivo activation of the response regulator ComA in *Bacillus subtilis*	2001년	195:179-183		유럽	O
계: 건수	10 건					

ㅇ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	발행기관	국 명
분자생물학회	Construction of *Bacillus subtilis amyE* deletion mutant using gene conversion	1995. 10		한국
한국산업미생물학회	Cloning and expression of a *Bacillus* sp. 79-23 cellulase gene in *E. coli* and *Bacillus subtilis*	1996. 4		〃
〃	Purification and characterization of a *Bacillus* sp. xylanase Y from recombinant *E. coli*	1996. 4		〃
한국농화학회	*Bacillus licheniformis* SK-5에서 생산된 a-amylase의 정제와 여러 protease 처리에 의한 구조변화 분석	1996. 5		〃
분자생물학회	Overexpression of *Bacillus licheniformis* amylase gene in *Bacillus subtilis* using the transcriptional enhancer, SacQ.	1996. 10		〃
한국산업미생물학회	국제협력에 의한 고초균(*Bacillus subtilis*) 유전체 전체 염기서열 해독완료 및 기능분석 연구의 진행	1997. 10. 25		〃
〃	Integration and amplication of the *Bacillus* sp. 79-23 cellulase gene in the *Bacillus subtilis* 168 chromosome	1998.		〃

학술회의 명칭	제목	게재연월일	발행기관	국 명
International Conference on Bacilli	Characterization of a catabolite-resistant sporulation mutant caused by *tnrA* null mutation in *Bacillus subtilis*,	1998. 7. 12-15		일본
한국산업미생물학회	Characterization of a catabolite-resistant sporulation mutant caused by a *tnrA* null mutation in *B. subtilis*	1998. 10. 28		한국
〃	*Bacillus licheniformis* 전분분해효소 유전자군의 구조	1998. 10. 28		〃
〃	Effective inducer of carboxymethyl cellulase in *Baicllus* sp. 79-23	1999. 4. 23		〃
〃	미생물유전체 연구동향: Full genome sequencing and functional genomics	1999. 10. 30		〃
〃	Analysis of *tnrA* alleles showing glucose-resistant sporulation phenotype in *Bacillus subtilis*	2000. 4. 28.		〃
〃	감마선 조사에 의한 Carboxymethyl cellulase 고생산성 *Bacillus* sp. 79-23 변이주의 개발	2000. 4. 28		〃
〃	*Bacillus*균의 포자형성기 발현 프로모터를 이용한 효소 고발현시스템	2001. 6. 21		〃
계: 건수	15 건			

3. 연구성과

Bacillus 균 형질전환 시스템, 돌연변이 기술 및 염색체상에서의 효소유전자 증폭기술, 유전자 발현시스템 재구성 등 *Bacillus* 균주 개발을 위한 기반기술을 확립하였으며, *Bacillus licheniformis*균, *Bacillus* sp. 79-23균, *Bacillus thuringiensis*균 등을 이용한 효소 생산 숙주균을 개발하였고 79-23균에 대해서는 특허출원 하였다. 포자형성기에 특이하게 발현되는 SEP promoter 및 mRNA 안정화인자를 이용하여 효소 고발현시스템을 개발하였고 SEP promoter 고발현시스템에 대하여 특허 출원하였다. *B. thuringiensis* 숙주균을 이용하여 개발한 중성 cellulase 생산용 *Bacillus* 균주의 생산수준이 300units/ml 에 도달하였으며, *B. licheniformis*균을 숙주로하여 개발한 α-amylase 생산용 균주의 경우 4,000 units/ml 수준에 도달하였다. 이들 개발균주에 대해 대용량 발효조를 이용하여 대량생산기술을 개발하였다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

본 연구를 통해 개발된 α-amylase 및 cellulase 생산용 균주들은 참여기업에 제공하여 현장에서의 생산시험을 진행하고 있으며 경제성이 확보되는 대로 기술이전을 할 계획임.

나. 활용방법

효소생산 개발균주는 α-amylase 및 cellulase 효소의 산업적 생산을 위한 산업균주로 활용하고 균주개발과정에서 확보한 유용한 기술들은 다른 효소 및 유용단백질 생산기술 개발에 활용함.

다. 차년도 이후 활용계획

개발된 균주와 기반기술에 대해 참여기업과 협의하여 다른 유용 단백질 생산기술 개발이나 차세대 효소 고생산 균주개발 연구의 토대로 활용.

5. 기대효과

- 섬유가공용 효소의 국내 생산으로 섬유가공용 효소의 수입 대체가 가능하고, 세균 유래 중성 cellulase 효소는 기존의 곰팡이 유래의 산성 cellulase 보다 부가가치가 높으므로 국제 시장에 수출 가능.
- 면직물의 고품질화를 통하여 섬유산업의 국제경쟁력을 확보하고 선진국형 고급 섬유산업 육성에 기여.
- α-Amylase와 cellulase는 섬유산업뿐만 아니라 전분산업, 식품산업, 제지산업 등 다방면으로의 활용이 가능함.
- 유용효소의 산업적 생산을 위한 platform technology를 확보하고, 균주개발에 관련된 신기술에 대해 특허를 획득하여 국내 미생물 발효산업 활성화에 기여.
- 본 연구에서 개발된 *Bacillus* 숙주균과 고분비 발현계는 다른 유용 재조합 단백질의 산업적 생산기술 개발에 파급효과 큼.

- 예상매출액 : 2,000 백만원
  수입대체효과 : 1,000 백만원
  수출증대효과 : 2,000 백만원
  원가절감(단위: 백만원,기존대비%),
  에너지절감효과(단위: 백만원,기존대비%),
  생산성 향상(단위: 백만원,기존대비%)
  인력양성 또는 고용창출효과(단위:명),
  투자유치실적((단위: 백만원),
  인프라구축 효과 등

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

여 백

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

산업용 효소인 내열성 α-amylase 및 cellulase를 고생산 할 수 있는 재조합 *Bacillus*균

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

■ 기술을 도출한 과제현황

<table>
<tr><td>과제관리번호</td><td colspan="4">M1-9808-00-0006</td></tr>
<tr><td>과제명</td><td colspan="4">섬유가공용 효소 생산을 위한 Bacillus 균주의 분자육종과 공업적 응용</td></tr>
<tr><td>사업명</td><td colspan="4">선도기술개발사업</td></tr>
<tr><td>세부사업명</td><td colspan="4">신기능생물소재 기술개발사업</td></tr>
<tr><td>연구기관</td><td colspan="2">한국생명공학연구원</td><td>기관유형</td><td>정부출연연구기관</td></tr>
<tr><td>참여기관(기업)</td><td colspan="4">(주) 제노포커스, (주) 상우화학</td></tr>
<tr><td>총연구기간</td><td colspan="4">1994년 9월 1일 ~ 2002년 8월 31일 (8년 개월)</td></tr>
<tr><td>총연구비</td><td colspan="4">정부(1,100,424)천원 민간(345,000)천원 합계(1,445,424)천원</td></tr>
<tr><td rowspan="3">연구책임자 1</td><td>성명</td><td>박승환</td><td>주민번호</td><td></td></tr>
<tr><td>근무기관
부서</td><td>한국생명공학연구원
미생물유전체연구실</td><td>E-mail</td><td>shpark@kribb.re.kr</td></tr>
<tr><td>직위/직급</td><td>책임연구원</td><td>전화번호</td><td>042-860-4410</td></tr>
<tr><td rowspan="3">연구책임자 2</td><td>성명</td><td>정홍채</td><td>주민번호</td><td></td></tr>
<tr><td>근무기관
부서</td><td>(주) 제노포커스
부설연구소</td><td>E-mail</td><td>hcjung@kribb.re.kr</td></tr>
<tr><td>직위/직급</td><td>연구소장</td><td>전화번호</td><td>042-862-4483</td></tr>
<tr><td rowspan="4">실무연락책임자</td><td>성명</td><td>박승환</td><td>소속/부서</td><td></td></tr>
<tr><td>직위/직급</td><td>책임연구원</td><td>E-mail</td><td>shpark@kribb.re.kr</td></tr>
<tr><td>전화번호</td><td>042-860-4410</td><td>FAX</td><td>042-860-4594</td></tr>
<tr><td>주소</td><td colspan="3">(305-600) 대전시 유성우체국 사서함 115</td></tr>
</table>

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요] -요소기술, 즉 *Bacillus*균 형질전환기술, 돌연변이기술, 유전자재조합기술, 염색체상 유전자 증폭기술, molecular evolution기술 등의 개발. -산업용 효소 생산을 위한 *Bacillus* 숙주균의 개발 -host-vector 시스템 구축, 단백질분해활성 저감, 효소생산용 최적 배지조성 등을 수행. -섬유가공용 셀룰라아제 생산을 위한 *Bacillus* 균주 개발 -stationary phase에서 발현되는 SEP promoter와 mRNA 안정화 인자를 이용하여 추진 -α-amylase 생산을 위한 균주 개발. -*B. licheniformis* 균주를 대상으로 염색체공학기술과 chemical mutagenesis를 함께 이용. -효소 자체의 성능 개선을 위해서 molecular evolution을 통해 비활성 증가된 cellulase 및 α-amylase의 개량연구 수행. **<기술적 특징>** · 포자형성기 발현프로모터를 이용한 효소 고발현 시스템을 개발하여 특허를 출원하였음. · *B.t.*균에서 유래된 SEP 프로모터를 이용한 본 발현시스템은 대수증식기를 지나 성장정지기에 목적효소가 발현되므로 효소 과생산으로 인한 숙주균의 성장저해 문제가 발생하지 않음. · 따라서 숙주에 독성을 나타내는 단백질의 생산에 적용될 수 있고, 특별한 발현유도 물질의 첨가없이 효소의 발현이 이루어지며, 생산된 효소를 쉽게 회수할 수 있는 시스템임. · 또한 여러 종류의 *Bacillus*숙주균에서 효소를 생산할 수 있는 우수한 효소발현 시스템임. · chemical mutagenesis, 유전자 재조합 및 염색체 공학기술을 함께 사용하여 균주를 개발함.
[용도 · 이용분야] (1) 섬유가공용 효소, 즉 내열성 α-amylase 및 중성 cellulase의 산업적 생산을 위한 산업균주로 이용 (2) 면직물의 고품질화를 통하여 섬유산업의 국제경쟁력을 확보하고 선진국형 고급 섬유산업 육성에 기여. α-amylase와 cellulase는 섬유산업 뿐만 아니라 전분산업, 식품산업, 제지산업 등 다방면으로의 활용이 가능함. (3) 다른 산업용 효소 및 유용단백질 생산을 위한 균주개발에 적용하여 개발기간을 단축할 수 있음

■ 기술의 분류

[기술코드] 413 (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(∨로 표시)하여 주십시오)

- ☐ 정보산업 ☐ 기계설비 ☐ 소재 ☐ 정밀화학·공정 ☑ 생명과학
- ☐ 원자력 ☐ 자원 ☐ 에너지 ☐ 항공·우주 ☐ 해양
- ☐ 교통 ☐ 보건·의료 ☐ 환경 ☐ 기초·원천 ☐ 기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(∨로 표시)하여 주십시오)

- ☐ 신제품개발 ☑ 신공정개발 ☐ 기존제품개선 ☐ 기존공정개선
- ☐ 기 타 ( )

[기술의 용도] (복수 선택(∨로 표시)가능합니다)

- ☐ 기계설비 ☐ 부품소자 ☑ 원료재료 ☐ 소프트웨어
- ☐ 가공처리기술 ☐ 자동화기술 ☐ 불량률 감소 등 현장애로기술
- ☐ 제품설계기술 ☐ 공정설계기술 ☐ 기 타 ( )

■ 산업재산권 보유현황(기술과 관련한)

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호
특허	중성 셀룰라아제를 생산하는 신규한 바실러스 속 79-23 균주	한국	등록	2001. 12. 11	등록 번호 제 0318554 호
특허	포자형성 의존성 프로모터를 이용한 목적 단백질의 생산방법	한국	출원	2000. 12. 15	출원번호 2000-77183

* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재
* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

■ 기술이전 조건

이전형태	☑ 유상 ☐무상	최저기술료	천원
이전방식	☐ 소유권이전 ☐ 전용실시권 ☐ 통상실시권 ☑ 협의결정 ☐ 기타( )		
이전 소요기간	년 개월	실용화예상시기	2004 년도
기술이전시 선행요건			

* 기술이전시 선행요건 : 기술이전을 위한 사전준비사항(필수 설비 및 장비, 전문가 확보 등)을 기술
* 실용화예상시기 : 기술을 활용한 대표적인 제품이 최초로 생산이 시작되는 시기를 기재

■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개만 선택(V로 표시)하여 주십시오)

	① **기초, 탐색연구단계** : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
	② **응용연구단계** : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
V	③ **개발연구단계** : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ **기업화 준비단계** : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ **상품화 완료단계**

[기술의 수명주기] (1개만 선택(V로 표시)하여 주십시오)

	① **기술개념 정립기** : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
	② **기술실험기** : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ **기술적용 시작기**: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
V	④ **기술적용 성장기**: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
	⑤ **기술적용 성숙기**: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ **기술적용 쇠퇴기**: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개만 선택(V로 표시)하여 주십시오)

	① **외국기술의 모방단계** : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② **외국기술의 소화·흡수단계** : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
V	③ **외국기술의 개선·개량단계** : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ **신기술의 혁신·발명단계** : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	□ **연구개발 계획** □ **연구개발 중** □ **연구개발 완료**
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호	M1-9808-00-0006			
과제명	섬유가공용 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균주의 분자육종과 공업적 응용			
사업명	선도기술개발사업			
세부사업명	신기능생물소재 기술개발사업			
연구기관	한국생명공학연구원		기관유형	정부출연연구기관
참여기관(기업)	(주) 제노포커스, (주) 상우화학			
총연구기간	1994년 9월 1일 ~ 2002년 8월 31일 (8년 개월)			
총연구비	합계 : (1,445,424)백만원 - 정부 : (1,100,424)백만원 민간 : (345,000)백만원			
연구책임자	소속	한국생명공학연구원 미생물유전체연구실	성명	박승환
	전화번호	042-860-4410	E-mail	shpark@kribb.re.kr
연구개발 주요내용				

먼저 *Bacillus* 산업균주 개발에 기반이 되는 요소기술, 즉 *Bacillus*균 형질전환기술, 돌연변이기술, 유전자재조합기술, 염색체상 유전자 증폭기술, molecular evolution기술 등의 개발을 수행하였고, 산업용 효소 생산을 위한 *Bacillus*숙주균의 개발을 추진하되 자연계 분리균 *Bacillus* 79-23, *B. licheniformis*균 및 *B. thuringiensis*균을 대상으로 연구하였으며, host-vector 시스템 구축, 단백질분해활성 저감, 효소생산용 최적 배지조성 등을 수행하였다. 섬유가공용 셀룰라아제 생산을 위한 *Bacillus* 균주 개발은 stationary phase에서 발현되는 SEP promoter와 mRNA 안정화 인자를 이용하여 추진하고, α-amylase 생산을 위한 균주 개발은 *B. licheniformis* 균주를 대상으로 염색체공학 기술과 chemical mutagenesis를 함께 이용하여 추진하였다. 또한 효소 자체의 성능 개선을 위해서 molecular evolution을 통해 비활성 증가된 cellulase 및 α-amylase의 개량연구를 수행하였다. 이러한 과정을 거쳐 개발된 균주를 이용하여 효소를 대량생산하기 위한 최적 배양조건 확립 및 공정개선을 도모하였고, 섬유가공용 효소의 시제품을 생산하였다.