

2006 년 8 월

碩士學位論文

수용성 β -1,3-glucan 생산을
위한 β -1,3-glucan synthase
클로닝 및 재조합 대장균 개발

朝鮮大學校大學院

化學工學科

尹春姬

수용성 β -1,3-glucan 생산을
위한 β -1,3-glucan synthase
클로닝 및 재조합 대장균 개발

Construction of soluble glucan producing
Escherichia coli by cloning β -1,3-glucan
synthase from *Agrobacterium* sp. ATCC31750

2006年 8月 25日

朝鮮大學校大學院

化學工學科

尹春姬

수용성 β -1,3-glucan 생산을
위한 β -1,3-glucan synthase
클로닝 및 재조합 대장균주 개발

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함.

2006年 4月

朝鮮大學校大學院

化學工學科

尹春姬

윤춘희의 석사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	차 월 석
위 원	조선대학교	교수	권 규 혁
위 원	조선대학교	교수	이 중 현

2006年 5月 日

朝鮮大學校大學院

목 차

LIST OF TABLES	VI
LIST OF FIGURES	VII
ABSTRACT	VIII
제1장	1
제2장 실험재료 및 방법	7
제1절 실험재료	7
제2절 수용성 β -1,3-glucan 생산을 위한 재조합 대장균주 개발	9
2-1 균주보관 및 플라스크 배양 배지조성	9
2-2 재조합 대장균주 개발	10
2-2-1 Genomic DNA Polymerase Chain Reaction	13
2-2-2 Conjugation with T-easy vector	15
2-2-3 Enzyme reaction	15
2-2-4 Conjugation with expression vector	15
2-2-5 Transformation to <i>Escherichia coli</i> Strain BL21 (DE3)	16
제3절 β -1,3-glucan synthase의 발현확인	22
제4절 회분식 발효공정실험을 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산	24
4-1 시약 및 기기	24
4-2 균주 및 보관	24
4-3 배지조성	25
4-4 배양방법	25
4-5 균체량, glucose 및 수용성 β -1,3-glucan 농도측정	25
4-6 NMR 분석을 이용한 수용성 β -1,3-glucan 구조분석	28
제3장 결과 및 고찰	29
제1절 PCR을 이용한 DNA 증폭	29
제2절 재조합 균주 개발	32
제3절 SDS-PAGE실험을 이용한 단백질 발현확인	32
제4절 회분식발효를 이용한 수용성 β -1,3-glucan의 생산	36
4-1 재조합 대장균주Crds-F와CC-term의 회분식발효를 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산성 확인	39
4-2 재조합 대장균주CC-term와Crds-C의 회분식발효를 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산성 확인	42

제4장 결론.....	44
참 고 문 헌.....	47

LIST OF TABLES

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study	20
Table 2. List of used primers for PCR cloning.....	21
Table 3. Solutions for preparing resolving gels for Tris-glycine SDS-polyacryl amid Gel Electrophoresis.....	23
Table 4. Media composition for soluble β -1,3-glucan production.....	27

LIST OF FIGURES

Figure.1. Starch and sucrose metabolism	4
Figure.2. Hydropathy profile of β -1,3-glucan synthase gene	5
Figure.3. Metabolic pathway of <i>Agrobacterium</i> sp. ATCC31750.....	6
Figure.4. <i>Agrobacterium</i> sp. ATCC31749 putative β -1,3-glucan synthase gene full sequence from NCBI.....	16
Figure.5. β -1,3-glucan synthase gene construction for cloning.....	17
Figure.6. The expression vector used for recombinant <i>E. coli</i> strain development	18
Figure.7. 1% Agarose gel electrophoresis of PCR cloned DNA fragments	30
Figure.8. Protein manifested confirmation of SDS-PAGE	33
Figure.9. Protein manifested confirmation of SDS-PAGE	34
Figure.10. Standard curve for the determination of glucose concentration.....	37
Figure.11. The cell growth, soluble glucan production and glucose consumption of the recombinant <i>E. coli</i> CrdS-F.....	39
Figure.12. The cell growth, soluble glucan productin and glucose consumption of the recombinant <i>E. coli</i> CN-term	40
Figure.13. The cell growth, soluble glucan production and glucose consumption of the recombinant <i>E. coli</i> CC-term.....	42
Figure.14. The cell growth, soluble glucan productin and glucose consumption of the recombinant <i>E. coli</i> CrdS-C.....	43

ABSTRACT

Construction of soluble glucan producing *Escherichia coli* by cloning β -1,3-glucan synthase from *Agrobacterium* sp. ATCC31750

Chun-Ji Yin

Advisor: Prof. Lee, Jung-Heon, PhD.

Department of Chemical Engineering.

Graduate School of Chosun University.

The water-soluble β -1,3-glucan is produced by recombinant *E.coli* in fermentation reactor. Following β -1,3-glucan synthesis metabolic pathway, UDP-glucose is the exclusive precursor for the synthesis of β -1,3-glucan. But UDP-glucose on as much as β -1,3-glucan production outside the conversion is possible even with the UDP-galactose. When the UDP-glucose increases conversions with β -1,3-glucan, it is that β -1,3-glucan synthase do to be revelation plentifully. In this study, for increase UDP-glucose to β -1,3-glucan reaction, we developed recombinant *E.coli* contain β -1,3-glucan synthase gene site. For a develop recombinant *E.coli*, From the Data Base of the NCBI the Putative of *Agrobacterium* sp.ATCC31749 β -1,3-glucan synthase catalytic subunit (gi:40556679) it used gene site.

Finally, the PCR reaction it amplified the DNA fragment and using

electrophoresis confirmed DNA fragment size. That purified protein have mass of 72kDa, 62KDa, 42KDa, 31KDa on SDS-PAGE respectively.

Keywords: *Agrobacterium* sp. ATCC31750; β -1,3-glucan synthase gene; Soluble β -1,3-glucan.

제 1 장 서론

유전자 재조합 기술은 경이적인 과학기술의 하나로 큰 주목을 끌고 있으며, 특정한 유전자를 분자유전학적인 방법으로 분리 또는 합성하여 유전자를 재조합 하거나 재조합된 새로운 유전자를 세균 등에 도입하여 특정한 생물활성물질을 저렴하게 대량생산 할 수 있어서 이미 선진국들은 실용화를 위하여 크게 투자하고 있다. 유전자재조합 기술은 분자수준에서 유전자를 조작하는 기술로서, 유전정보를 담고 있는 DNA 를 생체 외부의 환경에서 변환시킨 뒤 이 변환된 유전정보를 갖는 유전자를 다시 미생물 및 동물 세포에 주입하여 인간에게 유용한 물질을 만들어내도록 하는 기술이다. 변환된 유전자가 주입된 세포는 세포배양기술에 의해 최적발효 환경에서 배양되며, 이와 같은 유전자재조합 및 세포배양 기술로 인슐린, 인터페론, 간염백신, 성장호르몬 등과 같은 여러 가지 생물의약품을 대량 생산할 수 있다. 그러므로 유전공학은 21 세기의 새로운 산업혁명이라고 해도 과언이 아니다. 따라서 유전공학을 이용한 신규사업의 개발을 위하여 많은 기업들이 이의 연구개발에 착수하고 국가적 차원에서도 전략기술로 다루고 있으며 범 사회적 기술개발을 위하여 박차를 가하고 있다. 한국에서도 유전공학 분야를 국가가 육성해야 할 특정연구 분야로 지정하고 있으며 산업화를 위한 지속적인 연구가 행해지고 있다. 이러한 산업적 분위기에서 최근 생물산업 전반에 걸쳐서 미생물을 이용한 유용물질의 생산 및 산업적 활용에 많은 투자와 연구가 시행되고 있다.

버섯 균사체로부터 분비 되어 나오는 물질의 일종인 β -1,3-glucan 은 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포 증식과 재발을 억제하고 면역세포 기능을 활발하게 하는 인터루킨, 인터페론의 생성을 촉진 시키는 다당체 이다. β -1,3-glucan 은 구조적 특성으로 인하여 수용성 부분과 불용성 부분이 존재하며 총

함량의 38~69%가 수용성이라고 보고되었다. 수용성 β -1,3-glucan 의 응용은 광범위하며 주요하게 항생제 대체물질, 가축용 면역 증가제, 화장품 원료 첨가제, 인체 면역 활성화제 등으로 사용되고 있다.

최근에는 유전공학기술로 미생물을 이용한 단백질 및 glucan 생산기술이 많이 이용되고 있으며 대표적인 미생물로 대장균 및 효모를 사용하고 있다. 진행된 연구들은 성장능이 좋은 대장균주를 이용하여 재조합 대장균주를 개발함으로써 미생물을 이용한 다당류 생산을 시도하였다. (6,7,11,25) 세포의 성장 속도가 빠르고 생산 능력이 우수한 대장균 및 효모균을 이용하여 재조합 균주를 개발함으로써 원하는 생산물을 효율적으로 많이 생산해 내고자 하는데 목적이 있다. 이러한 유전자 조작 기술을 이용하여 수용성 glucan 을 생산해 내는 재조합 대장균를 개발하는데 관한 연구도 많이 진행되고 있으며 생산되는 다당류로는 β -glucan, α -D-glucan 등이 있다. (6,8,11,29) 그러나 최근에 재조합 대장균주를 이용한 수용성 β -glucan 생산에 관한 연구를 살펴보면 다양한 gene site 를 클로닝하여 재조합 균주를 개발함으로써 다당류 생산을 시도한 연구는 소규모였고 다당류 생산량이 최대로 1g/L 로서 생산성이 낮은 것이 단점이며 발효공정실험을 통한 대량 생산을 시도한 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 재조합 대장균주를 이용한 수용성 β -1,3-glucan 의 생산을 유도하기 위해 다양한 gene site 를 클로닝하여 균주개발하였고 발효공정실험을 통해 수용성 β -1,3-glucan 의 대량생산을 시도하였다. 다른 한 연구문헌에서는 불용성 β -1,3-glucan 대량 생산을 위한 재조합 *Agrobacterium* sp. strain 균주의 개발을 시도한 바가 있다. 그 연구에서는 *Agrobacterium* sp. ATCC31749 균주 내에서 β -1,3-glucan 합성에 중요한 작용을 하는 단백질로 추정되는 β -1,3-glucan synthase 에 관하여 중점적으로 연구를 하였으며 β -1,3-glucan synthase 의 gene sequence 를 밝혀내고 그 gene 의 Hydropathy profil 에 관한 연구를

진행함으로써 단백질 합성에서 활성부위로 작용하는 부분을 찾아냈었다. 이 연구 결과에 기초하여 본 연구실에서는 이미 β -1,3-glucan 합성 대사 경로를 추정하고 2D-PAGE 등 방법을 사용하여 그 합성에 중요한 작용을 하는 key metabolite 들도 이미 검출해 냈었다. (22,24)

본 연구에서는 이전의 연구와 달리 대사공학적인 관점에서 대장균을 숙주로 한 β -1,3-glucan 생산균주를 개발하고자 한다. 대장균은 그 성장이 빠르고 성장조건이 까다롭지 않아 생산균주로 적합한 특징을 갖고 있어 이미 많은 분야에서 생산균주로 사용되어 왔었다. 또한 문헌 조사를 통해 대장균은 Sucrose 또는 glucose로부터 β -1,3-glucan의 전구체인 UDP-glucose까지는 자체 분해 합성이 가능한 균주 [Figure 1]이므로 β -1,3-glucan의 생산을 위하여 필요한 β -1,3-glucan synthase를 발현할 수 있도록 하여 β -1,3-glucan의 생산이 가능한 재조합 *E. coli*를 개발하였다.

본 연구에서는 β -1,3-glucan synthase gene의 중심에 있는 활성부위 즉 친수성 부분을 중심으로 다양한 β -1,3-glucan-synthase gene site를 클로닝 함으로써 4개의 재조합 대장균주 개발하였다. 개발된 균주는 회분식 발효를 통하여 soluble glucan 생산을 확인하였다.

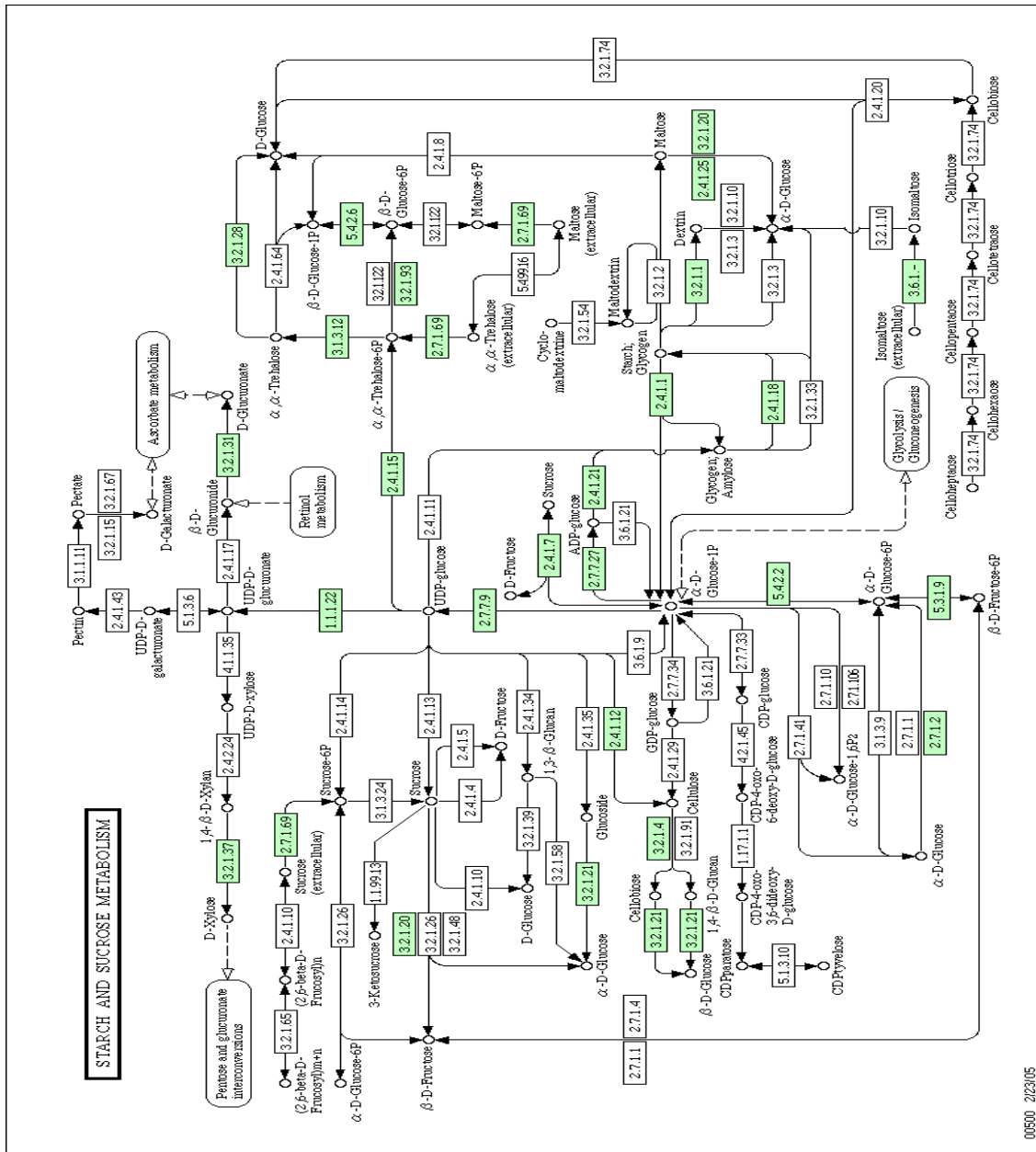


Figure 1. Starch and sucrose metabolism in *E. coli*. In this figure, the enzyme code in green box means the enzyme presented in *E. coli* strain

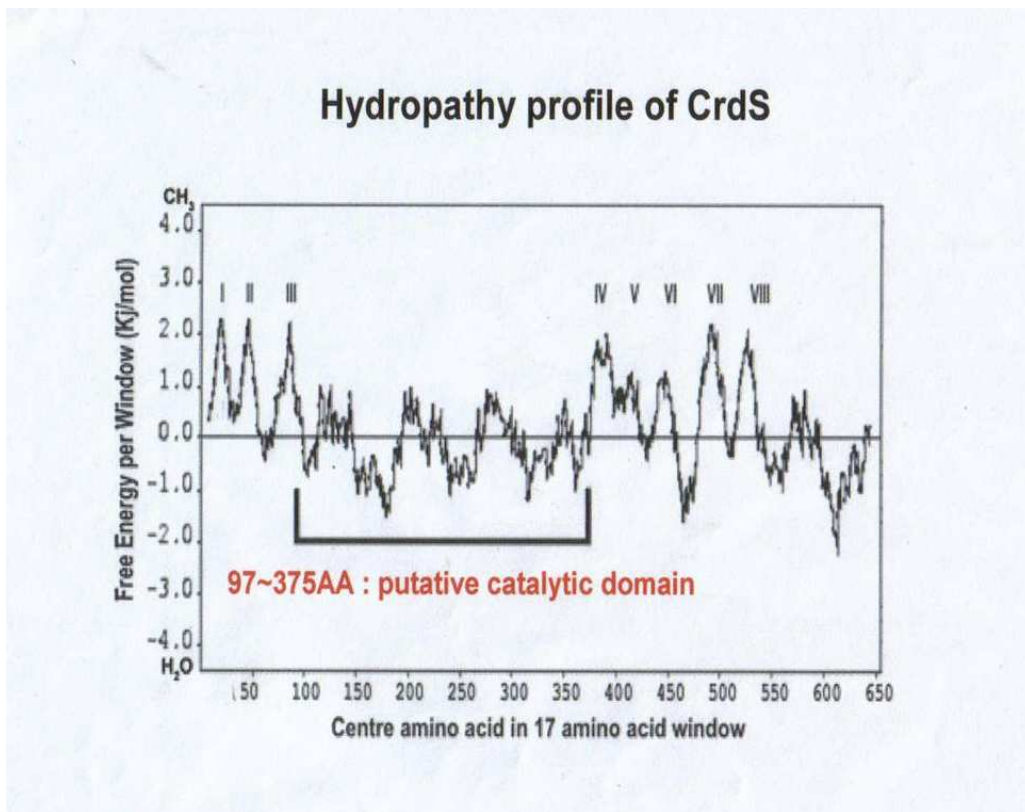


Figure 2. Hydropathy profile of CrdS. The plot (Kyte and Doolittle, 1982) is of the derived amino acid sequence of CrdS, using a window of 17 residues. The number of amino acids is plotted on the x-axis, and hydropathy is plotted on the y-axis. The bracket indicates the location of the region containing the conserved motifs shared by CrdS (amino acid residues 97~375) also a putative catalytic domain sequence.

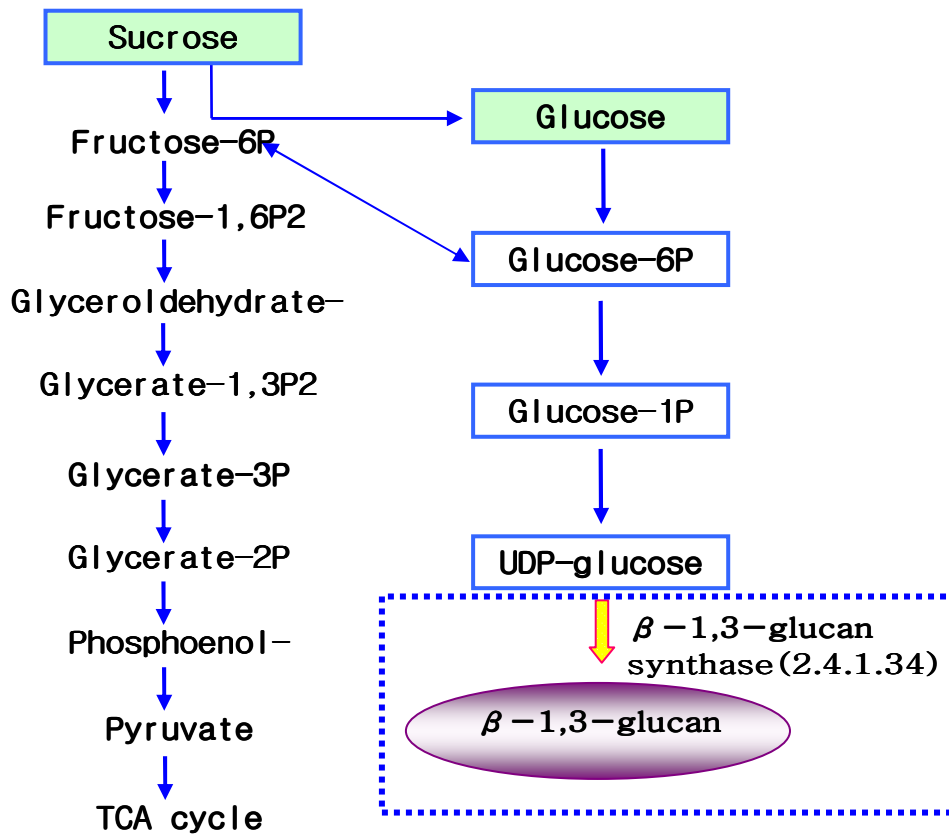


Figure 3. Metabolic pathway of *E. coli* mutant strains (In this figure the dotted line box means inserted part.)

제2장 실험재료 및 방법

제1절 실험재료

본 연구에서 사용한 균주로는 *Agrobacterium* sp.ATCC31750 과 *Escherichia coli* BL21(DE3) 및 *Escherichia coli* DH5 α 등 이다. (Table 1) 또한 본 연구에서는 DNeasy Tissue kit(QIAGEN, USA), Plasmid extraction kit (QIAGEN, USA), Gel extraction kit (QIAGEN,USA), Agarose-LE (Amersham bioscience, USA), PCR Cloning kit (QIAGEN, USA), Restriction enzyme(New England Biolabs, USA). T4 DNA Ligase(New England Biolabs, USA), T4 DNA Ligase Buffer(New England Biolabs, USA), glycerol(99%) (DC, KOREA), Acetic acid glacial (Merk, GERMANY), Acrylamide (Sigma, USA), Tris (hydroxymethyl, KOREA) aminomethane (Sigma, USA), Ammonium peroxodisulfate (Sigma, USA), Bromophenol Blue (Showa, Japan), N,N,N',N' -tetra methylene diamine (Sigma, USA), Glycine (Amersham Bioscience, USA), 30% Acrylamide/Bis Solution (Bio Rad, KOREA) 등 시약을 사용하였다.

사용한 기기로는 DNA 증폭용으로 Peltier thermal cycler(MJ Research PTC-200), 1차원전기영동장치로는 Mini electrophoresis (Bio-red, USA)를 사용하였고, DNA Agarose gel 전기영동장치로는 Run oneTm Electrophoresis cell (Embitec, USA)을 사용하였으며, DNA 전기영동확인장비로 Syngene bio imaging phramatech(Ingenios, USA)를 사용하였다. 세포벽파괴용으로 Sonic Dismemberator(Fisher 100 model, USA)를 사용하였고 세포분리용으로 Small high speed refrigerated centrifuge(Hanil Scientific, KOREA)을 사용하였으며 Enzyme reaction등의 반응을 유도하기 위해 circulator bath(RW-

0525G, USA)를 사용하였다.

제 2 절 수용성 β -1,3-glucan 생산을 위한 재조합 대장균 개발

2-1. 균주 보관 및 플라스크 배양 배지조성

본 연구에서 사용되는 *Agrobacterium* sp. ATCC31750 균주는 영양고체배지에서 30℃로 2일간 배양한 후, 4℃에서 보관하였고 2주마다 계대배양하여 생체활성을 유지하였고 long term stock 으로 만들어서 -80℃에 보관하였다. *Escherichia coli* BL21 (DE3)는 영양고체배지에서 37℃로 1일 동안 배양한 후, 4℃에서 보관하였고 2주마다 계대배양하여 생체활성을 유지하였고 long term stock을 만들어서 -80℃에 보관하였다.

Agrobacterium sp. ATCC31750 배양 시에는 YP 배지(Sucrose 20g/L, yeast extract 5g/L, peptone 5g/L)를 사용하였으며 30℃, 200rpm에서 배양하였다. *Escherichia coli* BL21 (DE3) 균주 배양시에는 LB 배지(Tryptone 10g/L, Yeast 5g/L, NaCl 10g/L)를 사용하였으며 37℃, 200rpm의 조건하에서 배양하였다.

2-2. 재조합 대장균주 개발

Glucan 생산 재조합 균주 개발하기 위하여 NCBI의 Data base로부터 *Agrobacterium* sp. ATCC31749의 putative β -1,3-glucan synthase catalytic subunit gene (gi:40556679)의 full site 정보를 이용하였다.[Figure 4.] 또한 본 논문에서 사용되는 균주인 *Agrobacterium* sp. ATCC31750은 *Agrobacterium* sp. ATCC31749로부터 생겨 나온 균주로서 유전학적으로 99% 이상 같은 균주로 간주된다. 그러므로 본 논문에서는 *Agrobacterium* sp. ATCC31749의 DB를 바로 *Agrobacterium* sp. ATCC31750에 적용하였다. Figure 3.에서 보는바와 같이 대장균은 β -1,3-glucan synthase 만 발현된다면 이론적으로 glucan을 생산 할 수 있다.

수용성 β -1,3-glucan 생산성이 좋은 재조합 대장균주를 개발하기 위해 본 연구에서는 아래와 같은 이유로 우선 4개의 다른 유전자를 설계하여 제작하였다[Figure 5].

① Crds-F

우선 *Agrobacterium* sp. ATCC31750내에서 불용성 β -1,3-glucan을 생산하는데 관여하는 중요한 효소인 β -1,3-glucan synthase의 full gene site(1964bp)를 대장균 숙주에 클로닝하여 한 개의 재조합 균주를 만들었다. 본 재조합 대장균주 개발목적은 성장능 및 생산성이 높은 대장균주를 이용하여 불용성 β -1,3-glucan을 생산하고자 하는 목적에서 개발하였다. 재조합 균주명은 Crds-F로 명명하였다.

② CN-term

두번째 균주는 Stasinopoulos *et al.*의 연구결과에 근거하여

putative catalytic domain gene site(288~1124bp)를 포함하여 앞의 소수성 부분을 추가한 부분으로서 Figure 4에서 gene site(1~1124bp)까지만 대장균 숙주에 클로닝하여 개발하였으며 재조합 균주명은 CN-term으로 명명하였다.

③ CC-term

세번째 균주는 putative catalytic domain gene site (288~1124bp)를 포함하여 뒤의 소수성 부분을 추가로 포함시켜 개발한 균주로서 Figure 4에서 gene site(288~1964bp)까지만 대장균 숙주에 넣어 만들었다. 이 균주는 CC-term로 명명하였다.

④ Crds-C

네번째 균주는 Stasinopoulos *et al.*의 연구결과에 근거하여 hydropathy profile를 봤을 때 활성부위로 판단되는 putative catalytic domain gene site(288~1124bp)만을 대장균 숙주에 클로닝하여 재조합 균주를 개발하였다. putative catalytic domain gene site 의 hydrophilic한 구조적 차이로 인하여 본 재조합 대장균주는 아마 불용성 β -1,3-glucan이 아닌 수용성 β -1,3-glucan을 생산할 것이라 추측하였다. 그리고 그 균주를 Crds-C으로 명명하였다.

위에서 설계된 네개의 균주는 모두 *E. coli* strain BL21(DE)를 숙주로 만들어 졌다. 재조합 대장균주중에서 2번째 균주와 3번째 균주는 β -1,3-glucan 합성 단백질의 활성부위를 포함하고 있으므로 만일의 경우 4번째 균주가 β -1,3-glucan 을 생산하지 못한다면 β -1,3-glucan 생산에 필요한 유전인자를 포함한 부위가 활성부위를 제외한 다른 어딘가에 있을지도 모른다는 추정하에 개발하였고 또한 불용성 β -1,3-glucan이 아닌 수용성 β -1,3-glucan을 생산해 낼

수도 있다는 추정으로 설계된 것이다.

2-2-1 Genomic DNA Polymerase Chain Reaction

본 연구에서는 PCR 을 이용하여 PCR cloning 을 진행하였다. 우선 Genomic DNA extraction kit(QIAGEN)을 사용하여 *Agrobacterium* sp.ATCC31750 로부터 Template DNA 를 추출하였다. PCR cloning 을 하기 위하여 PCR Premix Kit (Bioneer, Korea)을 이용하였고 primer design[Table 2]은 Figure 4.에 나와있는 gene sequence 에 의거하였으며 primer 합성은 한국기초과학연구원에 의뢰하였다.

PCR 반응실험 기본조건은 92~97℃에서 5분동안 denaturation 반응, 42~72℃에서 primer 의 annealing 반응시켜주며, 65~80℃에서 Taq polymerase 반응을 시켜줌으로써 cDNA 합성을 완성한다. 본 연구에서는 여러 차례 실험을 통해 가장 적합한 PCR 조건을 찾았다. 94℃에서 3분동안 변성반응을 시켜준 후 94℃에서 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 30초의 간격으로 30 cycle 증폭반응을 시켜줌으로써 primer annealing 을 진행하였고 나중에 72℃에서 5분동안 Taq polymerase 실험을 진행함으로써 cDNA 증폭반응을 실행하였다.

PCR Cloning(Polymerase Chain Reaction)실험을 한 각 DNA 단편은 Gel extraction kit(QIAGEN, USA)을 이용하여 정제하였고 PCR(Polymerase chain reaction) 산물은 1% Agarose 겔로 확인하였다. Agarose-LE 를 사용하여 1% Agarose gel 을 만들었고 DNA loading dye 를 사용하여 증폭된 DNA 단편을 1% Agrose gel 에 loading 하였고 running buffer 로 TAE buffer(Tris-acetate-EDTA-electro phoresis buffer)를 사용하였다. DNA 확인을 위하여 UV 를 쬐일 때 발광하는 형광물질인 EtBr(Ethidium bromide)를 사용하였다. 전기영동 실험조작은 20분 동안 진행하였으며 agarose

gel 에 UV 를 조사함으로써 결합된 EtBr 이 형광을 띠어 DNA 단편크기를 확인하였다.(Figure.8)

2-2-2 Conjugation with pGEM-T easy vector

PCR Cloning(Polymerase Chain Reaction) 실험을 한 각 DNA 단편은 Gel extraction kit(QIAGEN, USA)을 이용하여 정제하였다. PCR 반응결과를 확인하기 위하여 pGEM-T Easy vector (PCR cloning kit, QIAGEN)를 사용하였다. pGEM-T Easy vector 와 ligation 반응을 시킨 PCR 결과물을 *E. coli* strain DH5 α 에 transformation 시켰고 IPTG와 X-Gal를 이용하여 벡터와의 결합반응을 확인하였다. pGEM-T Easy vector와의 conjugation 반응은 16°C에서 4시간 진행하였고 결과물을 올리고 합성물의 분석은 한국기초과학연구원에 의뢰하였다. 염기서열분석을 확인한 후 발현벡터 pHCE19(II)와 conjugation시켰다.

2-2-3 Enzyme reaction

올리고 합성분석 확인 후 pGEM-T Easy vector 에 클론된 PCR 결과물을 얻기 위하여 제한효소반응 실험을 하였다. Restriction enzyme reaction 은 37°C에서 2 시간 반응시켰고 T⁴ DNA ligase 와 T⁴ DNA ligase buffer 는 NEB(New England Biolab)사의 것을 사용하였다. 결과물은 1% agarose 겔로 확인하였고 정제는 Gel extraction kit(QIAGEN, USA)를 사용하였다.

2-2-4 Conjugation with expression vector

단백질발현을 위하여 발현벡터 pHCE19(II)를 사용하였다.(Figure 6.) 제한효소로 자르고 나서 정제과정을 마친 증폭된 DNA 단편과 제한효소반응을 마친 발현벡터 pHCE19(II)와 22°C에서 4 시간 이상 conjugation 반응을 진행하였고 반응을 종료하기 위해 60°C에서 10 분

동안 반응함으로써 ligase 의 활성을 완전히 떨어뜨려 반응을 종료 하였다

2-2-5 Transformation to *Escherichia coli* strain BL21 (DE3)

단백질 발현능이 우수한 *E. coli* BL21(DE3) strain를 선정하여 실험균주로 사용하였다.

플라스미드는 DNA고리로 된 핵외 염색체인데 자기복제할 수 있으며 세포 몸 안팎으로 쉽게 출입할 수 있다. 플라스미드의 이 성질을 이용하여 다른 DNA 단편을 플라스미드의 DNA고리에 결합시켜 DNA의 운반체로 사용한다. 플라스미드를 세포 밖으로 끄집어낸 뒤 고리의 일부를 제한효소로 끊는다. 제한효소로 플라스미드의 고리를 끊고, 또 플라스미드 운반체에 끼울 유전자의 특정 부분의 DNA를 역시 제한효소로 끊어서 도막을 낸 뒤 이를 플라스미드의 끊어진 부분에 삽입하여 새로운 DNA의 고리를 만든다. 대장균은 CaCl_2 로 처리하면 세포벽이 얇아지며 외부의 DNA를 받아들인다. 이 방법에 의해서 대장균주에 DNA에 의한 형질전환이 가능하며 플라스미드를 운반체로 사용한다. 대장균을 숙주로 사용하고 4℃에서 Ca^{2+} 용액에 현탁시켜 재조합 DNA를 이에 가하면 도입된 재조합 DNA에 의한 형질이 표현된다. 클로닝된 재조합 대장균주 확인은 플라스미드의 선별표식자인 항생제 Ampicillin [50mg/l]의 내성을 이용하였다.

```

1   atgtatttca gtgctgaagg tgacgttcag tgggtgctct atgtgaacct acgattgcg
61  attggggcga tcctgtttgc ctttctcgct gatcccagaa agatggtcga aggttggcc
121 ttcagcatca tcatgttgct atcgcttggg gtctatatcg tatggcgggc acggatacc
181 ttgccgccgc cggaactctc ctcgaaacg ctctggtgct acacctattt accttcgag
241 ctgatctcgg tgcittatgc catgggggtcc atcctcatac ttcttcgccg accgactgg
301 tcagccgttg ccgatcaggg agaggcatat ctgacaggca acccgcatgc ccgctcgtc
361 gatgtgttta tctgactta caacgagccg ctgaacgttc tcgaaaaatc atcatcgcc
421 ggcgaggcga tggattatcc tcgactgcgc gtcttcgtct gtgacgacac cgtcgcggg
481 gaggtaaaga cctattgcca agcggcaggg gtgaactacg tcacacgtcc gacaacaag
541 cacgccaagg caggaaatct caacaatgcy ctgctccaca ccaatgcyct gaagaggtt
601 tccgacttca tcatggtcct cgacgcggat ttgcccccc aggcaactt ctgcgggcg
661 gtgacgggtc tcttttcgga cccgaagggt gctgtcgtcc agacgcctca ttctatttc
721 aacagtgatc caattcagca caatctcggg atagacaaga gcttcgtgga gaccagcgg
781 gtcttcttcg acgatttcca gccggccaag gatgccgttg gttgcgcttt cgcgtcggc
841 accagcttcg tcgtacgccg cgccgcggta aatgggtatt gtggtttccc acggatgcy
901 ctaccgaag acatgctgct gacatatcgc ctgatggaaa ggggatatgt acgcyctgg
961 ctgaatgaga agtggagcgt tggattgtcg gcggaagggt taccgaata atcacccag
1021 cgcaccgct ggtgtctcgg cacgatccag atcgggcttc tgcggaccgg cctctctgg
1081 cgtggaaatt ttacgtgac gcagcggctg cactatctgc atggactttt tgctggctg
1141 tcgaagccgc ttatcctgtg cctgctgctt gcgccgtcca tctattggct acgggcytg
1201 tcggcgtcgc aggtcgtatg gctgatgttc atgaagctcg gcctgtcatc ctgcyctt
1261 ttctggacct attccacctg gatatccggc aagaggacgc ttctctctt accgaagtc
1321 acccacgccc tgaccgctgt acccattacc atcacgcttt ttacggcaat cgtaaaccg
1381 ttcgggcgcc cgttcaaagt caccgaaaag ggaggagacc gatcccaggt cgtgtccac
1441 ctcccagcgg ggatttttt cgctttcgtg accctgtctt cggccgtctc atcgtgctg
1501 gctgtctatg gtctggatgc tccgtccgag ctgtcctcgc gggactgcct aatctgatc
1561 tggctccgcc tcgcatggtt tatcgattc accagcttca ttgctgcat gaattgccg
1621 cgtttcggca aggaggaaat gatcggagtg gattttcgcg ggcagttgcg tccgcatcc
1681 tcaacgagac cgtgcygtat caccggcctc tcgacggaaa acatcacact gctgcyggtt
1741 ccgtcttcca gcgatgtaa ggatgttttc gtaccggagg cggggtggat cggatcagc
1801 cctgcygagc acgcyagaa ctccgaaaag ttcgatattc atccaagcga gagcagcgc
1861 cggctcattt tgcgcctgtt gtttcgcaag gctcctgaaa atgtcgcgga cagggcgac
1921 ctgatgaaat ccatgcygat tcttctcgca cgggcattcg ggtga

```

Figure 4. *Agrobacterium* sp. ATCC31749 putative β -1,3-glucan synthase gene full sequence from NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.Fcgi?db=nucl eotide &val=40556679>)

Construction strategies for glucan synthase cloning

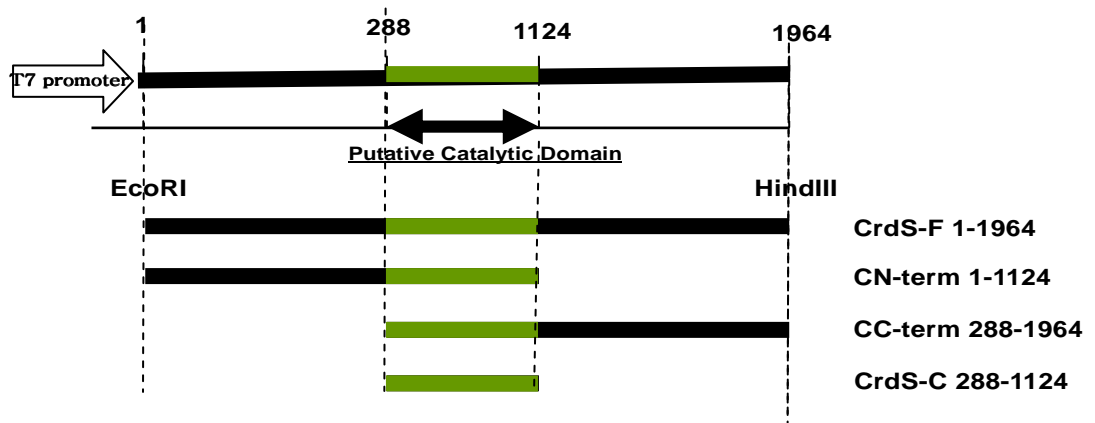


Figure 5. β -1,3-Glucan synthase gene construction for cloning.

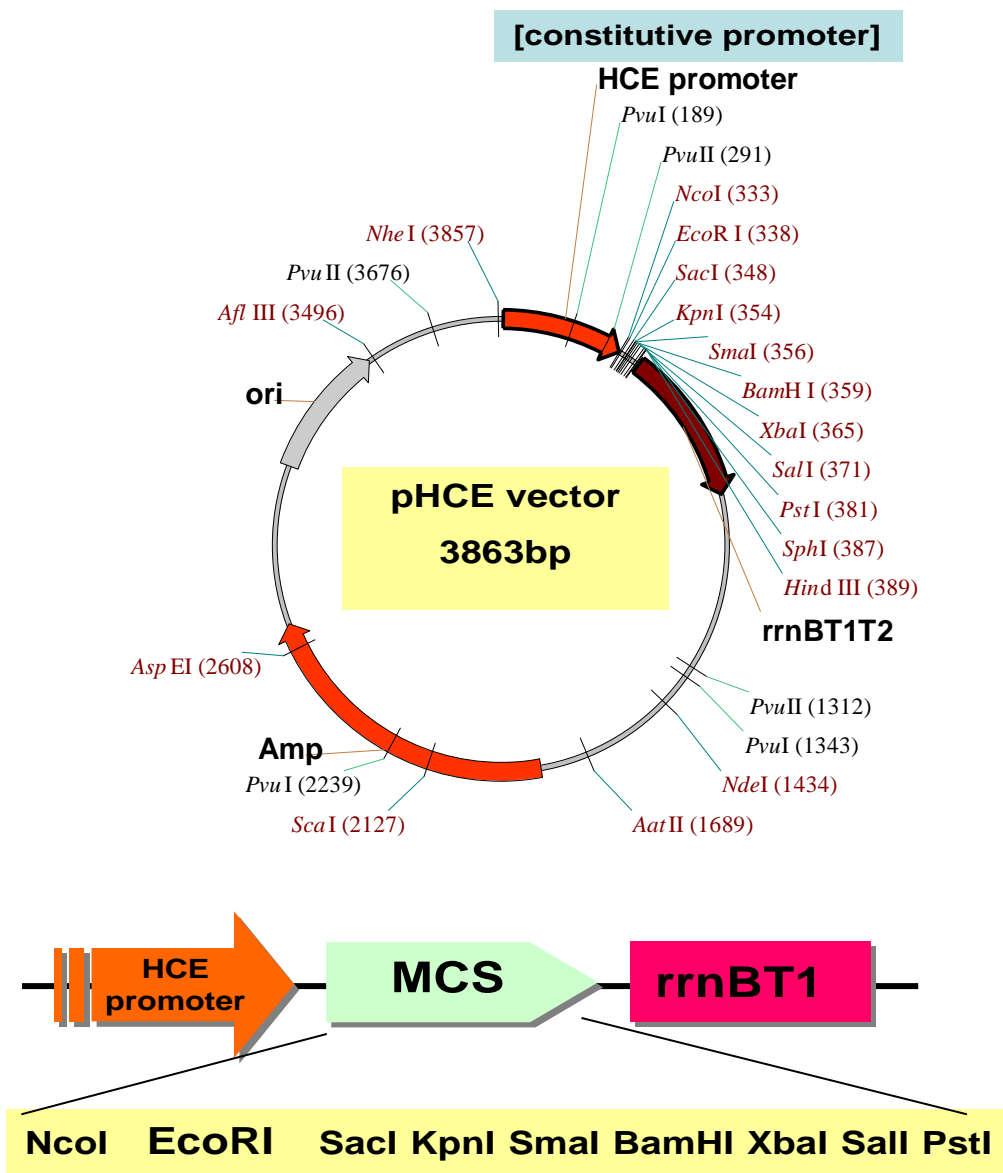


Figure 6. The expression vector used for recombinant *E. coli* strain development

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference of source
<i>Agrobacterium</i> sp.ATCC31750	CrdS ⁺ type strain	ATCC
CrdS-F(1964bp)	Full curdlan synthase gene 을 함유한 mutant	This study
CrdS-C(836bp)	Active catatlytic domain gene 을 함유한 mutant	This study
CN-term(1124bp)	Active catatlytic domain gene site 및 1-288 term site 를 함유한 mutant	This study
CC-term(1676bp)	Active catatlytic domain gene site 및 1124-1964 term site 를 함유한 mutant	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH 5 α	recA1 HSDr17	Gibco-
BL21 (DE3) (pLysS)	Res-Mod-ompT(λ DE3 with T7 pol) (pLysS with T7 lysozyme; Cmr)	BRL Novagen
Plasmid		
pHCE19 (II)	plasmid vector; Amp ⁺	

Table 2. List of Used Primers for PCR cloning

(1) Full gene site (CrdS-F) (1964bp):
5' -GAATTCATGTGATGTTTCAGATGCG-3' (sense oligonucleotide)
5' -AAGCTTATTTTCACCCGAATGCCCG-3' (antisense oligonucleotide)

(2) Active gene site (CrdS-C) (836bp):
5' -GAATTCATGGAACCGACTGGTCA.-3' (sense oligonucleotide)
5' -AAGCTTATTTCCATGCAGATAGTG-3' (antisense oligonucleotide)

(3) CN-term (1124bp)
5' -GAATTCATGTGATGTTTCAGATGCG-3' (sense oligonucleotide)
5' -CCATGCAGATAGTGCAGCCGCTGC-3' (antisense oligonucleotide)

(4) CC-term(1676bp)
5' -CCGAACCGACTGGTCAGCCGTTGC-3' (sense oligonucleotide)
5' -AAGCTTATTTTCACCCGAATGCCCG-3' (antisense oligonucleotide)

제 3 절 β -1,3-glucan synthase 발현 확인

본 연구에서는 재조합 균주 개발에 가장 중요한 효소인 β -1,3-glucan synthase의 분자량 측정 및 단백질 발현확인을 위해 SDS-PAGE 실험을 하였다.

실험은 아래와 같이 진행하였다. 5ml LB Amp⁺ 배지에서 키운 재조합 대장균주를 37°C에서 4시간 동안 키운 뒤에 100ml LB Amp⁺ 배지에 접종하였다. 플라스크에서 8시간 동안 배양한 후에 재조합 균주의 단백질 발현확인을 위하여 OD₆₀₀에서 흡광도를 측정하였고 똑같이 맞춰주었다.

정제하여 얻은 세포를 OD₆₀₀에서의 흡광도를 같게 맞춘 후 10mM Tris-buffer 완충용액으로 3번 이상 세척한 후 1ml 완충용액으로 현탁하였다. 초음파 파쇄기(Sonic Dismemberator, Fisher, USA)를 이용하여 10s씩 10번에 나누어 파쇄한 후 15,000rpm에서 10분 원심 분리하여서 수용성 단백질이 들어있는 상등액과 불용성 단백질이 들어있는 세포 침전물을 각각 회수하여 실험에 사용하였다. 전기영동은 10% separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel상에서 진행하였다. (Table 3.) 단백질과 5x SDS Sample Buffer (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% glycerol, 2% SDS, 14.4mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 혼합하여 100°C에서 7분간 증탕한 후 protein marker (Invitrogen, USA)와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 gel은 CBB(Coomassie brilliant blue R250) 염색약으로 염색하고 탈색용액으로 탈색반응 시킴으로써 원하는 단백질의 유무를 확인하였다.

Table 3. Solutions for preparing Acrylamide Gels for Tris–glycine SDS–polyacrylamide Gel Electrophoresis

10% separating gels	
Components (10% gel)	Gel volume (ml)
H ₂ O	2.6
30% acrylamide mix	1.0
1.5 M Tris(PH8.8)	1.3
10% SDS	0.05
10% ammonium persulfate	0.05
TEMED	0.004

5% Stacking Gels	
Components (5% gel)	Gel volume (ml)
H ₂ O	0.68
30% acrylamide mix	0.17
1.0 M Tris(PH8.8)	0.13
10% SDS	0.01
10% ammonium persulfate	0.01
TEMED	0.001

제 4 절 회분식 발효공정실험을 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산

본 연구에서는 회분식 발효조를 이용하여 재조합 대장균의 수용성 β -1,3-glucan의 생산을 확인하고자 하였다.^(7,12,21)

4-1. 시약 및 기기

본 연구에서는 탄소원으로 glucose(대한제당)와 질소원으로 NH_4Cl (Junsei, Japan), 인산염으로 KH_2PO_4 (동양)을 사용하였고 미량원소로 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 은 동양제품을 구입하여 미량원소 용액으로 제조하여 사용하였고 소포제로 antifoam 204 (Sigma,USA)를 사용하였다. 발효조는 용존산소농도 분석과 pH조절기능을 장착한 Fermentor (Bio-tron, korea)를 사용하였다.

4-2. 균주 및 보관

본 연구에서 사용되는 대장균주 *Escherichia coli* BL21 (DE3)는 long term stock을 만들어 -80°C 에 보관하여 매번 사용할 때마다 100ul씩 취하여 5ml tube culture, 200ml Flask culture 등 단계를 차례로 밟아 파장 600nm에서 흡광도 수치가 1일 때 즉 세포 활성이 가장 좋을 때 접종균주로 사용하였다.

4-3. 배지조성

본 연구에 *Escherichia coli* BL21(DE3) 균주 배양시 사용된 종배양 배지는 LB(Tryptone 10g/L, Yeast 5g/L, NaCl 10g/L) 배지이다. 본 배양 배지조성은 sucrose 60g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, NH₄Cl 4g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L 그리고 10ml/l의 미량원소 용액 (0.1N HCl 1L에 5g FeSO₄ · 7H₂O, 2g MnSO₄ · H₂O, 0.5g CaCl₂, 1g ZnCl₂, 1g ZnCl₂, 1g CoCl₂ · 6H₂O를 녹여 만들)으로 배양액을 만들었다. 배지는 121 °C에서 15분간 멸균 후에 사용하였으며 pH 조절을 위하여 2N HCl, 2N NaOH를 사용하였다.[Table 4.]

4-4. 배양방법

본 연구의 회분식 배양에서는 본 발효의 10%에 해당하는 플라스크 배지 200ml를 만들어 진탕배양기에서 3~4시간 동안 배양한 후 OD₆₀₀=1이 되었을 때 1.8L의 본 배지에 접종하였다. 본 배지의 pH는 7.0으로 고정하여 실험을 수행하였고, 배양온도는 37 °C, 교반속도는 초기 300rpm에서 600rpm으로 용존산소 농도에 준하여 조절하였으며 통기량은 0.5vvm으로 조절하여 배양하였다.

4-5. 균체량, glucose 및 수용성 β-1,3-glucan 농도측정

균체량은 원심분리를 이용하여 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전된 균체를 증류수로 3회 세척한 후 80 °C dry oven에서 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였다. 최종 생산물인 수용성 β-1,3-glucan은 에탄올 침전법을 이용하여 회수하여 80 °C dry oven에서 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였다. Glucose 농도 분석은 DNS

(Dinitrosalicylic Acid) 방법을 이용하여 측정하였다.⁽³⁹⁾

Table 4. Media composition for soluble β -1,3-glucan production

Components	Concentration (g/l)
Sucrose	60
NH ₄ Cl	4
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
Trace element	10ml/l
Initial pH 7.0	

Trace element

Components	Concentration (g/l)
FeSO ₄ •7H ₂ O	5
MnSO ₄ •H ₂ O	2
CaCl ₂	0.5
ZnCl ₂	1
CoCl ₂ •6H ₂ O	1
Solvent (0.1N HCl)	

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 PCR 을 이용한 DNA 증폭

미생물을 재조합 하는 기술개발로 유전공학의 획기적인 발전을 이루었으며 대표적인 기술은 PCR 의 발전이다. PCR 은 특정 유전물질을 짧은 시간 내에 대량으로 얻을 수 있게 하였다.

PCR 반응을 통하여 클로닝할 DNA 단편을 대량증폭하였다. PCR을 이용하여 대량 증폭한 유전자의 정확성을 확인 하기 위해서는 agarose 겔을 통하여 DNA의 크기가 일정하고 농도가 높은지를 확인해야 한다. 만약 PCR 조건이 맞지 않아 결과가 나쁜 경우에는 여러 개의 DNA 밴드가 같이 겹쳐 보이거나, 밴드가 선명하지 않거나, 또는 합성되지 않은 경우도 있다. 그러므로, PCR반응 산물을 확인하기 위하여 DNA 전기영동실험을 진행하였다.

실험 결과 정확하게 1964bp, 1676bp, 1124bp, 836bp 사이즈에서 증폭된 DNA 단편을 확인함으로써 적용한 PCR 조건이 본 실험에 정확성을 확인하였다.[Figure 7]

PCR실험을 통하여 얻은 증폭된 유전자는 말단에 poly-A 유전자를 포함하고 있다. 그러므로 증폭된 유전자의 말단이 염기서열 T로 끝나는 T-easy vector에 cloning 하여 발현 및 염기 서열 A과 T의 맞물림을 확인하여야 한다. 최종적으로 그 결과물을 발현 벡터에 클로닝하여 대장균주에 형질전환시켜 재조합 대장균주를 개발하고자 한다. 본 연구에서도 PCR실험을 통해 깔끔하게 복제된 DNA 단편들을 정제하여 T-easy vector에 cloning하여 염기서열의 맞물림을 확인하였다. 클로닝된 T-vector를 정제하여 한국기초과학연구소에 염기서열분석을 의뢰하였고 염기서열분석을 통해 PCR실험을 이용하여 대량 증폭한 DNA 단편과 T-easy vector와의 ligation정확성을 확인하였다. 즉

PCR반응을 거쳐서 염기서열 A로 끝나는 증폭된 DNA 단편과 끝 맞물림이 T로 되어 있는 T-easy vector와의 ligation반응을 통해 A와 T의 맞물림이 정확하게 되어 있음을 확인함으로써 발현벡터에 클로닝한 DNA 단편을 정제하였다. 실험을 통해 본 연구에서 개발하고자 하는 재조합 유전자의 증폭이 예측한 결과와 일치 하고 그 결과로 얻은 DNA fragment는 Figure 7 에 나타내었다.

PCR : Genomic DNA prep : 5' EcoRI / 3' HindIII primer

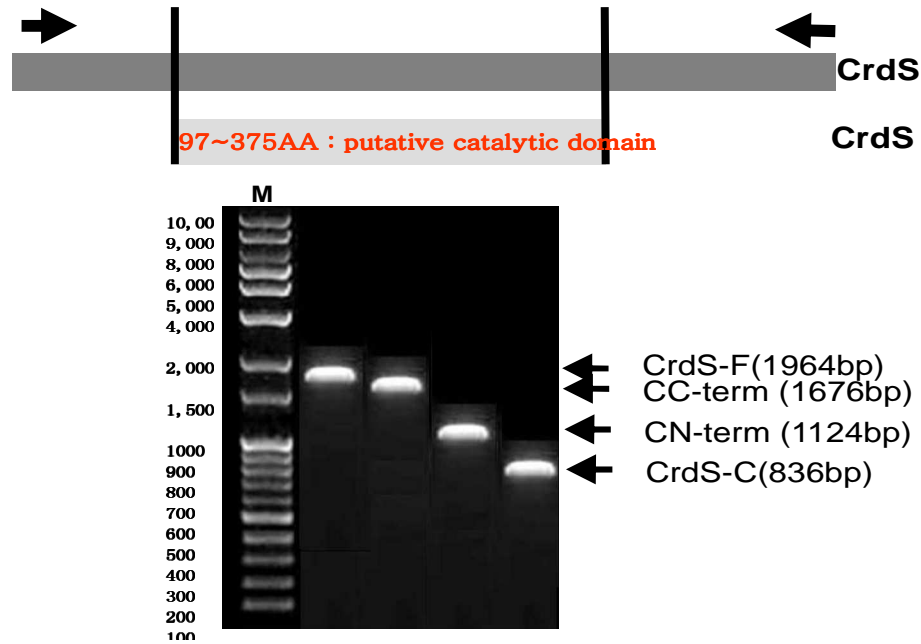


Figure 7. 1% Agarose gel electrophoresis of PCR cloned DNA fragments of *crds*-F, *crds*-C and CC-term, CN-term. Lanes: M: DNA marker (10,000; 9,000; 8,000; 6,000; 5,000; 4,000; 2,000; 1,500; 1,000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100 bp); *Crds*-F: β -1,3-glucan synthase gene (1964bp); *Crds*-C: β -1,3-glucan synthase putative catalytic domain (836bp). CN-term: Contain Active catalytic domain gene site and 1-288 term site (1124bp) CC-term: Active catalytic Contain domain gene site and 1124-1964 term site (1676bp)

제2절 재조합 균주 개발

대장균주 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하여 competent cell을 만들어서 -80°C 에 보관하여 사용한다. Competent cell 100ul에 발현백터에 클로닝한 유전자를 heat shock 방법으로 42°C 에서 1분 30초 반응시킴으로써 재조합 대장균주를 개발하였다. PCR을 통하여 증폭해 놓은 DNA 단편들을 실은 백터를 숙주세포 *E. coli* BL21(DE3)에 주입하고 플라스미드의 선별표식자인 항생제의 내성을 이용하여 재조합 대장균주를 선별하였다.

재조합 대장균주는 Long term stock을 만들어서 -80°C 보관하여 사용하였다.

제 3 절 SDS-PAGE 를 이용한 단백질 발현확인

유전자 재조합을 통하여 균주를 개발한 후 단백질 발현을 확인하였다. 10% SDS-PAGE(Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 실험을 통해 선별된 재조합 균주의 단백질 발현을 확인한 결과 Figure 8,9와 같다.

재조합 균주와 대조균의 whole cell 상태에서의 단백질 발현 상태를 비교해 본 결과 재조합 대장균주는 각각 72KDa, 62KDa, 42KDa, 31KDa의 위치에서 대조균주인 *E. coli* BL21(DE3)과는 선명하게 다른 단백질 발현을 확인하였다.[Figure 8]. 본 실험결과 각 재조합 균주는 우리가 원하는 형태의 단백질을 정확히 발현하고 있음을 보여 주었다. 재조합 균주에서 발현된 단백질이 수용성인지 불용성 인지 확인하기 위하여 sonicator를 이용하여 세포벽을 파쇄하고 세포 내 단백질을 추출하여 수용성인 상등액 부분과 불용성인 세포침전물을 분리 회수하여 SDS-PAGE 상에서 확인한 결과 Figure 9과 같았다.

Figure 9에서 보는 바와 같이 재조합 *E. coli* CrdS-F(72KDa), CC-term(62KDa), CN-term(42KDa)는 불용성 단백질 발현이 비교적 많은 것이 확인된 반면에 CrdS-C(31KDa)은 수용성 단백질 발현이 많음을 확인하였다. 이는 재조합 균주를 개발하기 위한 DNA 단편을 설계할 때 예측과 동일 하였다. Crds-C에 삽입된 DNA 단편은 친수성 부위만 함유하고 있고 다른 세가지 DNA 단편들은 모두 친수성, 소수성 부위가 섞여 있었으므로 이와 같은 결과를 보여 주는 것으로 판단된다.

이들이 발현하는 단백질이 glucan 생산에 결정적으로 관여 하는 gene site인지 확인하기 위해 발효공정을 적용하였다.

pET expression system

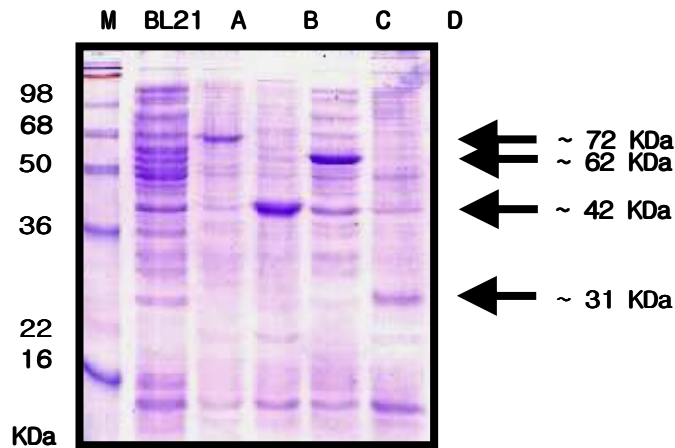


Figure 8. Overexpressed recombinant β -1,3-glucan synthase gene in *E. coli*, separated by SDS-PAGE with a 10% gel under equal condition. Lanes 1, M-marker; Lane 2, BL21-*E. coli* BL21(DE3); Lane 3, A- recombinant *E. coli* strain crds-F whole cell; Lane 4, B- recombinant *E. coli* strain CN-term whole cell; Lane 5, C- recombinant *E. coli* strain CC-term whole cell; Lane 6, D- recombinant *E. coli* strain crds-C whole cell. Positions of molecular size markers are shown in kilodaltons.

pET expression system

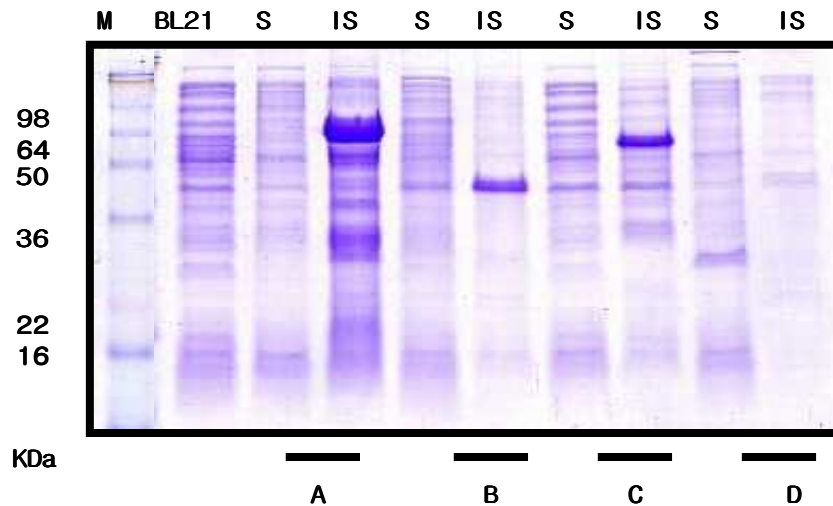


Figure 9. Overexpressed recombinant β -1,3-glucan synthase gene in *E. coli*, separated by SDS-PAGE with a 10% gel under equal condition. Lane 1, M—marker; Lane 2, *E. coli* BL21 (DE3) whole cell; Lane 3 and 4, soluble and insoluble fraction of *E. coli* carrying crds-F; Lane 5 and 6, soluble and Insoluble fraction of *E. coli* carrying CN-term; Lane 7 and 8, soluble and insoluble fraction of *E. coli* carrying CC-term; Lane 9 and 10, soluble and insoluble fraction of *E. coli* carrying crds-C. Positions of molecular size markers are shown in kilodaltons.

제 4 절 회분식 발효를 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산

본 연구에서는 만들어진 재조합 균주들의 생산성을 알아보고자 회분식 발효를 하였다. pH 및 온도가 제어되는 회분식 발효기에서 46 시간 동안 세포를 성장 시키면서 세포농도, 수용성 β -1,3-glucan 농도를 측정 하였다.

실험결과 재조합 균주 CC-term 는 IPTG 를 넣어주고 발효공정 실험을 시작한 6 시간 되는 때부터 수용성 β -1,3-glucan 생산을 시작하였고 최대로 1.0g/L 의 수용성 β -1,3-glucan 을 생산하였다. [Figure 13.] 또한 재조합 균주 CrdS-C 는 같은 조건하에서 발효실험을 시작한 6 시간 되는 때부터 수용성 β -1,3-glucan 을 생산하였고 최대로 5.9g/L 의 생산성을 보였다. [Figure 14.] 반대로 재조합 균주 CrdS-F 와 CN-term 는 β -1,3-glucan 을 생산하지 않았다. [Figure 11, 12]

균주 설계 시 예상한 바와 같이 CrdS-C은 수용성 β -1,3-glucan을 생산하였으며 그 양이 비록 1.0g/L에 머물렀지만 발효공정을 최적화하고 배지 최적화를 진행한다면 더 높은 생산성을 보일수 있다고 생각한다. 또한 재조합 대장균주 CrdS-C에 클로닝한 DNA단편을 대장균내에서 단백질발현이 우수한 발현 벡터에 실어 새로운 재조합 균주를 만든다면 더 높은 생산성도 보일 것이라 생각한다.

본 연구를 통해 β -1,3-glucan의 생산에 관여하는 친수성 부위가 *Agrobacterium* sp.균주가 아닌 대장균주에서도 발현하며 또한 수용성 β -1,3-glucan도 생산해 내는 것을 확인 하였다.

또한 *Agrobacterium* sp.균주의 대사과정에서 β -1,3-glucan 을 생산하는 가장 중요한 gene site인 β -1,3-glucan synthase gene의 full gene site를 삽입하였을 때 단백질 발현을 확인할수 있었지만 β -

1,3-glucan 이 생성되지 않는데 관한 의문을 가져보았다. β -1,3-glucan synthase gene은 β -1,3-glucan synthase 라는 membrane 단백질을 발현하는 gene이다. *Agrobacterium* sp.에서 작동했던 β -1,3-glucan 이 합성되는 기작은 membrane에서 일어났었는데 β -1,3-glucan synthase를 제외한 다른 membrane protein들이 관여했을 가능성도 높으며 또한 대장균 내에서는 같은 기작이 일어나지 않음을 알 수 있었다. 즉 대장균이 불용성 β -1,3-glucan을 생산하려면 반드시 그 membrane에서 β -1,3-glucan 합성이 일어나야 할 것으로 판단된다.

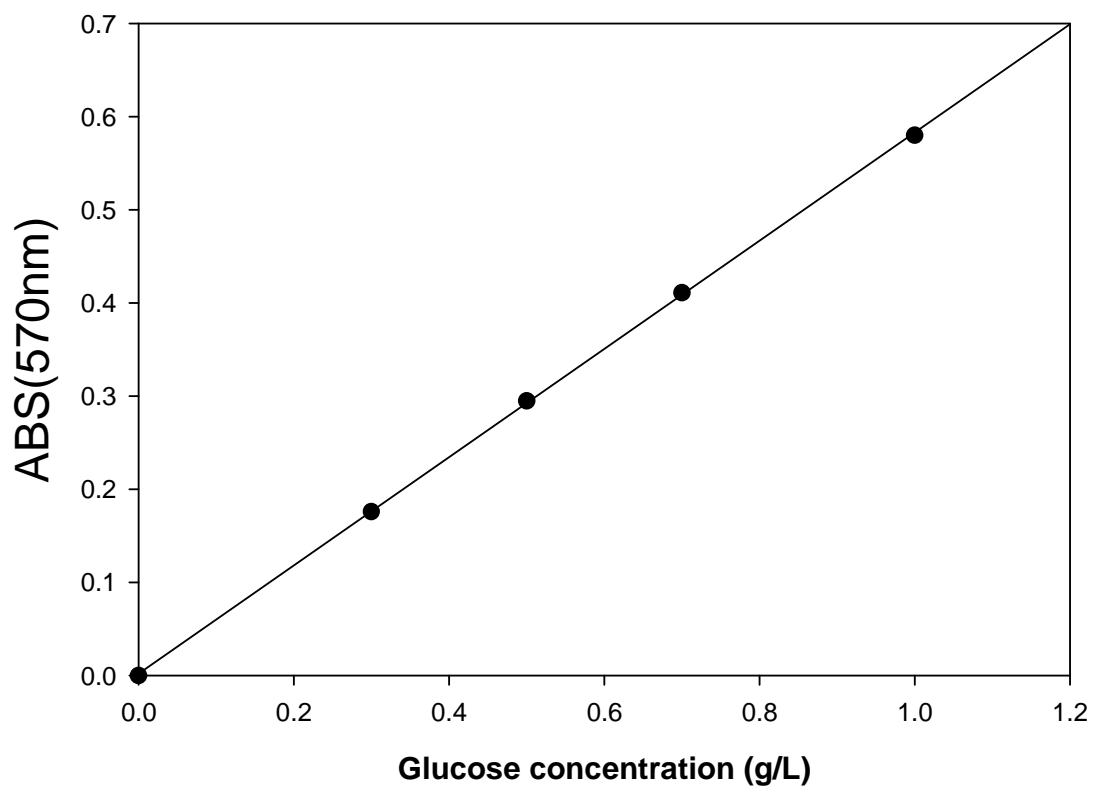


Figure 10. Standard curve for the determination of glucose concentration

4-1 재조합대장균주 Crds-F 와 CC-term 의 회분식 발효를 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산성 확인

β -1,3-glucan synthase gene 을 함유한 재조합 대장균주 Crds-F 는 탄소원인 glucose 가 충분한 조건하에서 24 시간 동안 회분식 발효실험을 통해 수용성 β -1,3-glucan 생산을 유도한 결과 세포의 균체량은 최대로 3.8g/L 의 빠른 성장속도만 보였지만 수용성 β -1,3-glucan 생산에 기여하지 않았다.[Figure 11]

Active catalytic domain gene site 및 β -1,3-glucan synthase gene site 에서 1~288 term site 를 함유한 재조합 대장균주 CN-term 역시 탄소원이 충분하고 균주가 성장하기에 적합한 조건을 맞춰준 조건하에서 24 시간 동안 회분식 발효실험을 이용해 수용성 β -1,3-glucan 생산을 유도하였다. 실험결과 재조합 대장균주 CN-term 는 성장능이 우수한 특성을 보였으며 세포의 균체량은 최대 5.4g/L 로 늘었으나 수용성 β -1,3-glucan 생산에는 기여하지 않았다.[Figure 12]

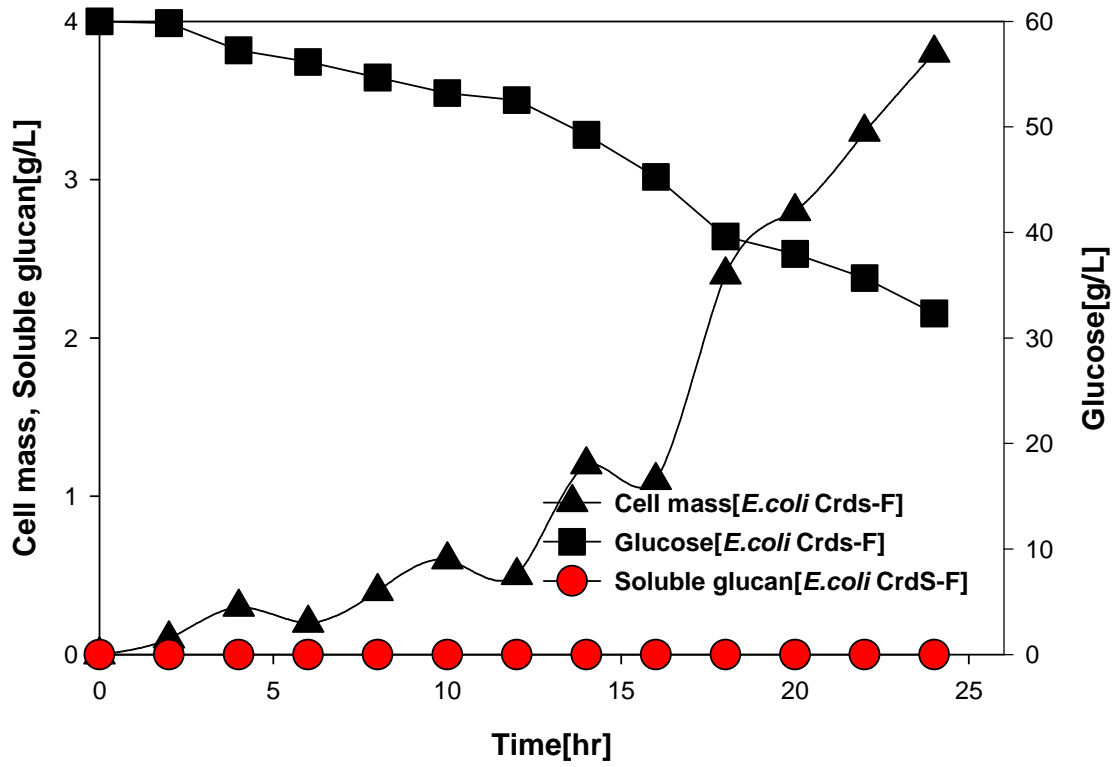


Figure 11. The cell growth, soluble glucan production and glucose consumption of the recombinant *E. coli* Crds-F

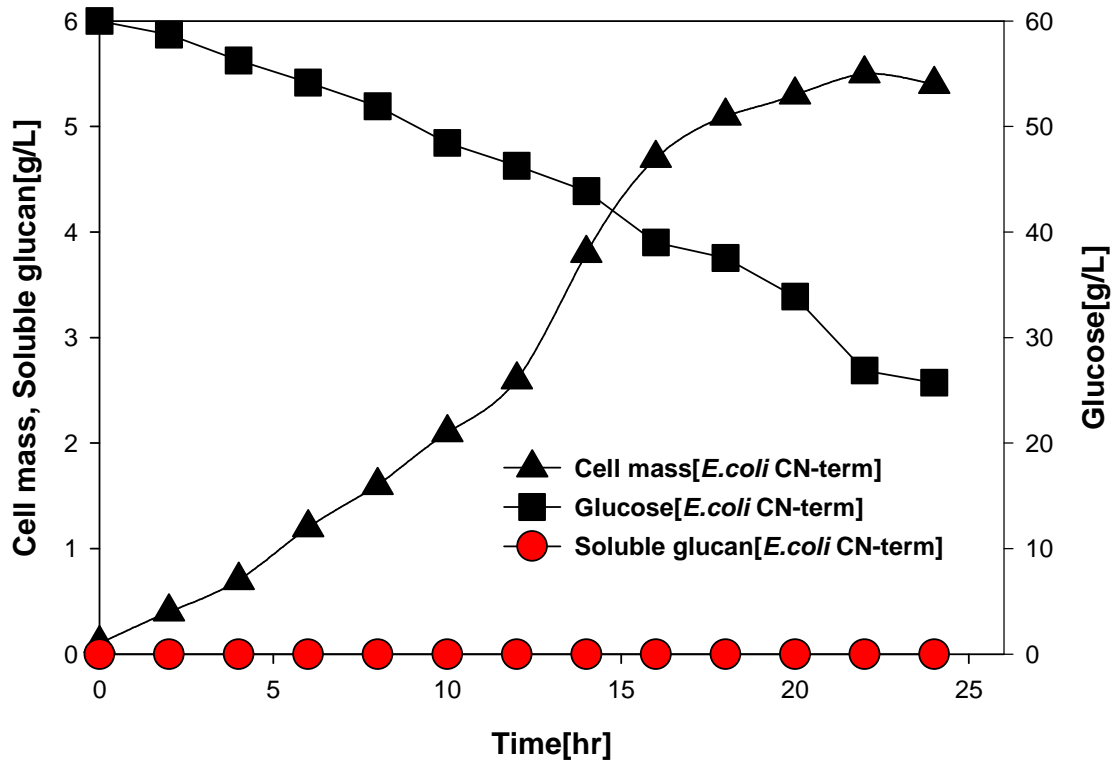


Figure 12. The cell growth, soluble glucan production and glucose consumption of the recombinant *E. coli* CN-term

4-2 재조합대장균주 CC-term 와 Crds-C 의 회분식 발효를 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산성 확인

Active catalytic domain gene site 및 β -1,3-glucan synthase gene site 에서 288~1964 term site 를 함유한 재조합 대장균주 CC-term 는 탄소원이 충분하고 균주가 성장하기에 적합한 조건을 맞춰준 전제하에서 24 시간 동안 회분식 발효실험을 이용해 수용성 β -1,3-glucan 생산을 유도하였다. 실험결과 재조합 대장균주 CC-term 는 발효공정실험을 시작한지 6 시간 되는 시점부터 수용성 β -1,3-glucan 을 생산하였으며 세포의 균체량은 최대로 5.4g/L 로 늘어났고 또한 최대로 1.1g/L 의 수용성 β -1,3-glucan 생산성을 선보였다. [Figure 13]

Active catalytic domain gene site 를 함유한 재조합 대장균주 Crds-C 역시 탄소원인 glucose 가 충분한 조건하에서 24 시간 동안 회분식 발효실험을 이용해 수용성 β -1,3-glucan 생산을 유도한 결과 재조합 대장균주 Crds-C 는 발효공정실험을 시작한 4 시간 되는 시점부터 수용성 β -1,3-glucan 을 생산하였다. 실험결과 세포의 균체량은 5.8g/L 들어가면서 빠른 성장속도를 보였고 5.9g/L 의 수용성 β -1,3-glucan 을 생산함을 확인할수 있었다. [Figure 14].

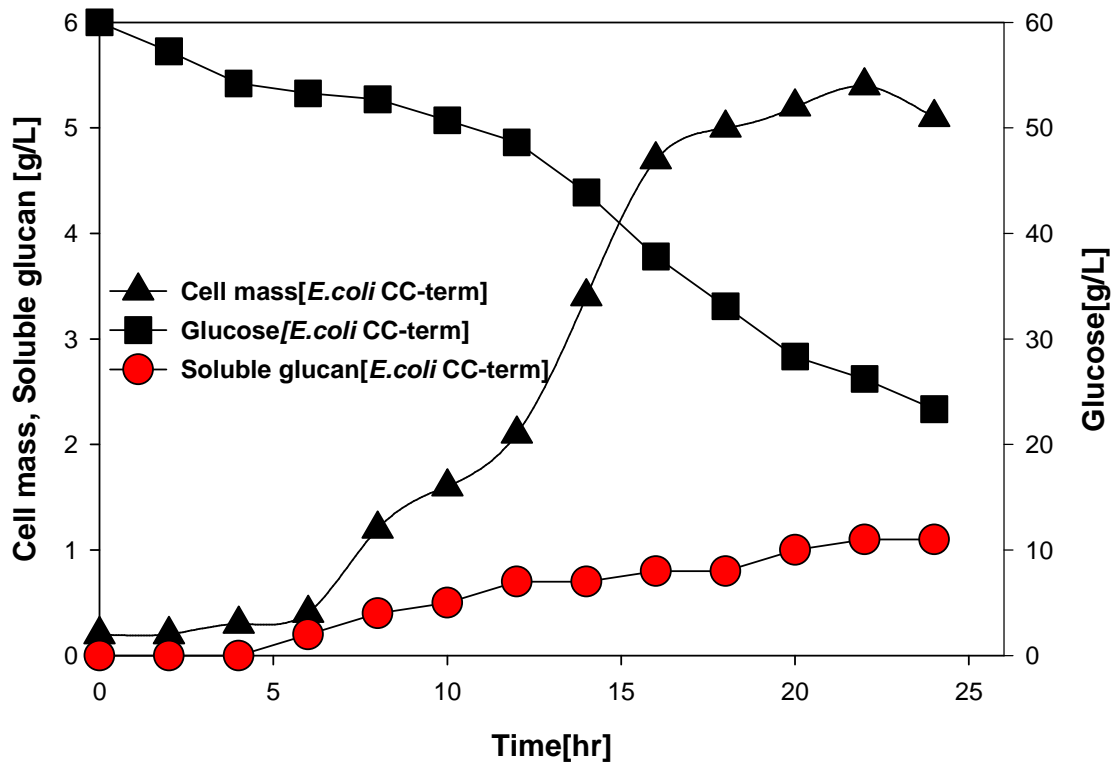


Figure 13. The cell growth, soluble glucan production and glucose consumption of the recombinant *E. coli* CC-term

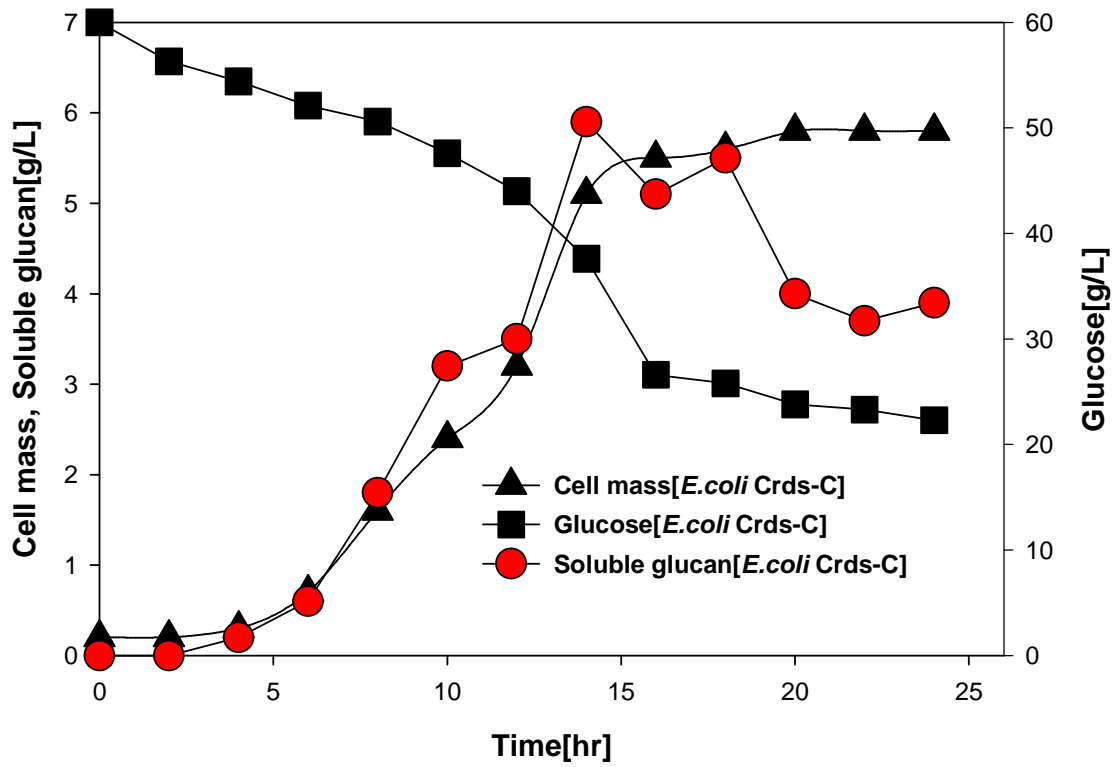


Figure 14. The cell growth, soluble glucan production and glucose consumption of the recombinant *E. coli* CrdS-C

제 4 장 결 론

본 연구에서 재조합 균주 개발목적은 성장능 및 생산능이 좋은 대장균을 이용하여 불용성 β -1,3-glucan을 생산해내고자 연구를 시작하였고 이로하여 이중균주인 *Agrobacterium* sp. ATCC31750로부터 β -1,3-glucan생산에 가장 중요한 작용을 하는 β -1,3-glucan-synthase gene에 관한 정보를 얻었고 이러한 유전정보를 대장균에 이용하였다. 대장균의 합성대사과정을 살펴보면 β -1,3-glucan을 생산하는 대사과정에서 UDP-glucose에서 β -1,3-glucan을 합성하는 유일한 가장 중요한 합성효소인 β -1,3-glucan synthase 가 없다. 이러한 정보에 의하여 대장균의 대사과정에서 β -1,3-glucan의 생산에 필요한 단 하나의 중요한 효소인 β -1,3-glucan-synthase gene site만을 넣어줌으로써 재조합 대장균주를 개발하였다. β -1,3-glucan synthase gene을 클로닝 하여 재조합 대장균주를 개발하고 회분식 발효실험을 진행하였지만 불용성 β -1,3-glucan 을 생산하지 않았고 수용성 β -1,3-glucan 생산에만 기여하였고 다양한 β -1,3-glucan synthase gene을 클로닝하였을 때 유전자 구조적 차이에 의하여 생산물의 변화에 많은 차이가 있다.

연구결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

본 연구에서 사용한 *Agrobacterium* sp.ATCC31750에 의해 질소원이 고갈된 상태에서만 생성되는 불용성 β -1,3-glucan 은 세포의 membrane에서 생성되고 나중에 세포밖에 방출되어 세포를 감싸고 있는 biopolymer이다. 재조합 대장균주를 이용하여 불용성 β -1,3-glucan을 생산하려고 시도하였지만 수용성 β -1,3-glucan만을 생산하는 이유는 대장균주와 *Agrobacterium* sp.ATCC31750의 구조적 차이에서 나타난다. *Agrobacterium* sp.ATCC31750은 박테리아의 일종으로서 세포벽은 얇은 펩티도 글리칸 층을 갖고 있는데 이 얇은

층은 매몰된 단백질과 부착된 다당류를 갖고 있는 두꺼운 외부 지질층으로 둘러싸여 있는 것에 비해 대장균의 세포벽은 복잡하다. 대장균의 세포벽은 내막과 외막으로 나뉘어 있으며 막 사이에 젤라틴 층을 갖고 있다. 이러한 구조적 차이로 인하여 *Agrobacterium* sp.ATCC31750에 의해 질소원이 고갈되었을 때 생성되는 불용성 β -1,3-glucan은 세포막에서 생성되고 나중엔 세포벽을 둘러싸고 있는 biopolymer 이지만 대장균은 두 층으로 구성된 세포막과 얇은 세포벽의 구조적 차이로 인하여 세포막에서 불용성 β -1,3-glucan을 생성하지 못한다.

또한, β -1,3-glucan 생산을 위하여 β -1,3-glucan synthase gene을 다양한 gene site로 클로닝하여 개발한 4개의 재조합 균주를 이용한 수용성 β -1,3-glucan 생산성도 다른것이다. β -1,3-glucan synthase의 hydrophathy prophile에 근거하여 gene site를 4가지 분류로 나누었다. β -1,3-glucan synthase gene site는 hydrophilic한 구조를 가지고 있고 active catalytic domain gene site는 hydrophobic한 구조를 가지고 있다. 이러한 구조적 차이로 인하여 생성되는 수용성 β -1,3-glucan의 생산물 차이를 알아보기 위하여 4가지 균주를 개발하였다. 발효공정 실험을 통하여 재조합 대장균주의 생산물 분석을 통해 많은 차이점을 발견하였다.

Hydrophobic한 구조를 가지고 있는 재조합 대장균주 CrdS-C는 네개의 균주중에서 가장 많은 수용성 β -1,3-glucan 생산성을 보였고 hydrophilic한 구조를 가지고 있는 재조합 대장균주 CrdS-F는 수용성 β -1,3-glucan 생산에 기여하지 않는다.

본 연구를 통하여 클로닝 하여 넣은 gene site의 구조적 차이에 의한 생산물의 차이점을 알아보았고 발효공정실험을 통해 재조합 대장균주의 최종 산물인 수용성 β -1,3-glucan의 생산성을 확인하였다. 앞으로 수용성 β -1,3-glucan의 생산량을 높이기 위해 발효공정최적화를

실행한다면 더 좋은 결과를 얻을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Chan, T.W.D., P.K. Chan, and K.Y. Tang, Determination of molecular weight profile for a bioactive $[\beta]-(1 \rightarrow 3)$ polysaccharides (Curdlan). *Analytica Chimica Acta*, 2006. **556**(1): p. 226.
2. Colleoni-Sirghie, M., D.B. Fulton, and P.J. White, Structural features of water soluble (1,3) (1,4)- $[\beta]$ -glucans from high- $[\beta]$ -glucan and traditional oat lines. *Carbohydrate Polymers*, 2003. **54**(2): p. 237.
3. Cui, W., N.A.M. Eskin, and C.G. Biliaderis, NMR characterization of a water-soluble 1,4-linked $[\beta]$ -glucan having ether groups from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) mucilage. *Carbohydrate Polymers*, 1995. **27**(2): p. 117.
4. Degani, H., et al., ^{13}C - and ^1H -NMR studies of osmoregulation in *Dunaliella*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1985. **846**(3): p. 313.
5. Dorion, S. and J. Rivoal, Quantification of uridine 5'-diphosphate (UDP)-glucose by high-performance liquid chromatography and its application to a nonradioactive assay for nucleoside diphosphate kinase using UDP-glucose pyrophosphorylase as a coupling enzyme. *Analytical Biochemistry*, 2003. **323**(2): p. 188.

6. Funane, K., et al., Water-soluble and water-insoluble glucans produced by *Escherichia coli* recombinant dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydrate Research*, 2001. **334**(1): p. 19.
7. Gao, H.-J., Q. Wu, and G.-Q. Chen, Enhanced production of (-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002. **213**(1): p. 59.
8. Hanada, N., et al., Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus sobrinus* gtfU gene that produces a highly branched water-soluble glucan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 2002. **1570**(1): p. 75.
9. Harada, T., A. Misaki, and H. Saito, Curdlan: A bacterial gel-forming [beta]-1, 3-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968. **124**: p. 292.
10. Harada, T., et al., Effect of heating on formation of curdlan gels. *Carbohydrate Polymers*, 1994. **24**(2): p. 101.
11. He, H.-J., et al., High-Level Expression of Human Extracellular Superoxide Dismutase in *Escherichia coli* and Insect Cells. *Protein Expression and Purification*, 2002. **24**(1): p. 13.
12. Igarashi, I., et al., *Babesia bigemina*: In Vitro and in Vivo Effects of Curdlan Sulfate on Growth of Parasites. *Experimental Parasitology*, 1998. **90**(3): p. 290.

13. Kabir, M.M. and K. Shimizu, Gene expression patterns for metabolic pathway in *pgi* knockout *Escherichia coli* with and without *phb* genes based on RT-PCR. *Journal of Biotechnology*, 2003. **105**(1-2): p. 11.
14. Kai, A., et al., Analysis of the biosynthetic process of cellulose and curdlan using ^{13}C -labeled glucoses. *Carbohydrate Polymers*, 1994. **23**(4): p. 235.
15. Kai, A., et al., Biosynthesis of ^{13}C -labeled branched polysaccharides by *pestalotiopsis* from ^{13}C -labeled glucoses and the mechanism of formation. *Carbohydrate Polymers*, 1998. **35**(3-4): p. 271.
16. Kei, M., et al., ^{13}C -NMR investigations of synthetic branched polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 1986. **6**(2): p. 155.
17. Kim, M.-K., et al., Enhanced production of (1 \rightarrow 3)-[beta]-glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species. *Biochemical Engineering Journal*, 2003. **16**(2): p. 163.
18. Kim, Y.-T., et al., Structural characterization of [beta]- (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 2000. **328**(3): p. 331.
19. Lee, Y.-J., J.J. Choi, and S.-T. Kwon, Cloning, expression, and partial characterization of a family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon

- Sulfophobococcus zilligii. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. **38**(6): p. 821.
20. Li, M., et al., Effect of lpdA gene knockout on the metabolism in Escherichia coli based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by ¹³C-labeling experiments. *Journal of Biotechnology*, 2006. **122**(2): p. 254.
 21. Pei, D., et al., Expression of both Chlamydia pneumoniae RNase HIIs in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 2005. **40**(1): p. 101.
 22. Phue, J.-N. and J. Shiloach, Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in E. coli B (BL21) and E. coli K (JM109). *Journal of Biotechnology*, 2004. **109**(1-2): p. 21.
 23. Sanchez, A.M., G.N. Bennett, and K.-Y. San, Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in Escherichia coli to increase succinate yield and productivity. *Metabolic Engineering*, 2005. **7**(3): p. 229.
 24. Seljelid, R., et al., A soluble [beta]-1,3--glucan derivative potentiates the cytostatic and cytolytic capacity of mouse peritoneal macrophages in vitro. *Immunopharmacology*, 1984. **7**(1): p. 69.

25. Sugawara, T., et al., Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 2004. **339**(13): p. 2255.
26. Takahashi, F., et al., Structure of curdlan that is resistant to (1 → 3) [beta]—glucanase. *Carbohydrate Polymers*, 1986. **6**(6): p. 407.
27. Vergunst, A.C. and P.J.J. Hooykaas, Recombination in the Plant Genome and its Application in Biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1999. **18**(1): p. 1.
28. Yalin, W., P. Yuanjiang, and S. Cuirong, Isolation, purification and structural investigation of a water-soluble polysaccharide from *Solanum lyratum* Thunb. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005. **36**(4): p. 241.
29. Yuan, L.Z., et al., Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 2006. **8**(1): p. 79.
30. Zhang, H., et al., A molecular description of the gelation mechanism of curdlan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2002. **30**(1): p. 7.
31. Rajaram A. Pai, Michael F.Doherty and Michael F. Malone, DeSIGN OF Reactive extraction systems for Bioproduct

Fecoverly, *AIChE Journal*, Vol. 48, Issue 3 (2002) pages 514–526.

32. Yulei Wang, Aindrila Mukhopadhyay, Victoria F. Howitz, Andrew N. Binns, David G. Lynn, Construction of an efficient expression system for *Agrobacterium tumefaciens* based on the coliphage T5 promoter, *Gene*, vol. 242 (2000), pages 105–114.
33. Tara Karnezis, Helen C. Fisher, Gregory M. Neumann, Bruce A. Stone and Vilma A. Stanisich, Cloning and Characterization of the phosphatidylserine synthase Gene of *Agrobacterium* sp. Strain ATCC 31749 and Effect of Its Inactivation on Production of High–Molecular–Mass (1→3)– β –D–Glucan (curdlan), *Journal of Bacteriology*, Vol. 184 (2002), pages 4114–4123.
34. Zonglie Hong, Zhongming Zhang, John M. Olson, and Desh Pal S. Verma, A Novel UDP–Glucose Transferase Is Part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate, *Plant cell*, Vol. 13, No. 4 (2001), pages 769–780
35. Stan J. Stasinopoulos, Paul R. Fisher, Bruce A. Stone and Vilma A. Stanisich, Detection of two loci involved in (1→3)– β –glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene, *Glycobiology*, Vol. 9, No. 1 (1999), pages 31–44.

36. Topological characterization of an inner membrane (1→3)- β -D-glucan (curdlan) synthase from *Agrobacterium* sp. strain ATCC31749, *Glycobiology*, Vol. 13, No. 10(2003), pages 693–706.
37. Lee, M.H., Studies on the Separation and Application of Biopolymer Produced by *Agrobacterium* sp. ,*M.S. Thesis*, Chosun University, 2003.
38. Srienc, F., B. Arnold, J. E. Bailey, Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* 36:982–987, 1984
39. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426–428, 1959.
40. Campbel, J.A., G.Davies, V. Bulone, and B.Henrissat. A classification of nucleotide–diphospho–sugar glycosyltransferase based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 326:929–939.1997.