

# 양조용 효모, *Saccharomyces cerevisiae*의 이용성 다양화



황 용 일

〈경남대학교 식품공학과 교수〉

## ■ 目 次 ■

- I. 서 론
- II. 실용효모의 분자육종기술의 개발
- III. 효모의 유용단백질 생산기술의 개발

## I. 서 론

청주나 맥주등 일반적인 알코올 제조에 이용되고 있는 *S. cerevisiae*, 즉, 양조용 효모(실용효모)는 오랜세월을 거쳐 경험적인 선발에 의하여 공업적으로 뛰어난 특성을 지니고 있으며 그 자신이 귀중한 유전자자원이다. *S. cerevisiae*는 성격상 두가지로 분류되며 현재 각 연구기관에서 실험용으로 이용되는 균주와 양조용으로 선발개량된 실용효모로 나뉘어 진다.

효모가 지니는 이들 유용형질을 지배하는 유전자를 파악하고 육종에 응용하기 위해서는 변이 유발, 성적교잡, 세포융합과 형질전환등의 기술이 필요하다. 그렇지만 이러한 기술은 후자의 실

용효모에 적용하기에는 이하의 문제점이 대두된다. 즉, 이들효모는 특성상 포자형성능이 거의 없으며 균주개량을 위해 필요한 접합능을 나타내는 감수분열 분리체를 얻기 어렵다. 그리고 영양요구성등의 효과적인 선택부호가 없기때문에 세포융합에 의한 무성적인 접합체 또는 형질전환체의 선택분리가 곤란한 점등을 들 수 있다. 더우기 이배체 혹은 그이상의 배수체이기때문에 변이주를 얻기어렵고 변이처리에 의한 유용형질에 손상을 줄 수 있다.

이러한 육종에 곤란한 점에도 불구하고 실용효모에 대한 분자육종은 현재까지 끊임없이 시도되고있다. 실용효모에 형질전환체의 선별을 위한 선택부호의 개발을 위해서는 아미노산중의

라이신생합성계 중간대사산물인  $\alpha$ -aminoadipate- $\delta$ -semialdehyde가 축적하면 효모가 생육불능으로 되는 점을 이용하여  $\alpha$ -adipic acid내성균주를 분리하여 실용효모에서 *lys2*변이주(小田 et al., 1988)가 분리되었으며 나아가 *ura3*변이주등이 분리되었다. 그리고 플라스미드 벡터계를 이용하여 실용효모에 새로운 형질을 부여하기 위하여 벡터의 선택부호로 G418 (Jimenz and Davis, 1980)등의 약제내성, 금속이온(구리)내성을 부여하는 *CUP1*유전자 (Fogel and Welch, 1982)가 이용되고 있다. 이러한 방법으로 개발된 실용효모의 숙주·벡터시스템을 이용하여 이종유전자를 도입하거나 이미 알려진 유전자의 발현을 제어하는 새로운 육종이 시도되고 있다. 잘 알려진 예로 *S. diastaticus*의 glucoamylase의 유전자 *STA1*을 G418내성 유전자를 선택부호로 맥주효모에 도입하여 얻어진 glucoamylase생산균주를 이용하여 당화와 발효가 동시에 가능하게 하였다 (坂井, 1987). 나아가 맥주효모의 응집성에 관여하는 유전자 *FLO1*을 비응집성의 맥주효모나 청주효모, 와인효모에 도입하여 각각의 균주들에 응집성을 부여하였다 (Watari et al., 1991). 그리고 맥주효모의 diacetyl생산을 억제하기 위하여 *Enterobacter aerogenes*의  $\alpha$ -acetolactate탈탄산효소의 유전자 *ALDC*를 맥주효모에 도입하여 diacetyl생산을 감소시켰다 (Sone et al., 1988). 이미 알려진 유전자의 제어에 의한 균주 육종법으로는 *LEU4*유전자를 고발현시키면 청주의 향기성분의 하나인 isoamyl acetate가 다량으로 생성하였다 (Hirata and Hiroi, 1991). 그뿐아니라 황화수소생성 억제유전자 *NHS5*를 맥주효모에 도입하여 황화수소의 생성을 억제시키며 (手塚, 1990), 특정유전자파괴법에 의한 요소를 생산하지 않는 청주효모가 육종되었다 (Suizu et al., 1990).

위와같이 유전자의 도입이나 유전자의 수식에

의하여 새로운 성질을 지니는 실용효모의 육종이 가능하다. 그렇지만 본보의 후반부에서 기술되는 유용단백질의 다량생산을 위한 이종유전자의 재조합에 의한 효모의 육종기술은 신물질의 공업적인 생산을 위해서는 가능하다. 그러나 실용효모를 이용한 식품의 대량생산을 위해서는 소비자의 관점에서 거부감을 가질 수 있으며 일본등지에서는 식품에 한하여 효모자체의 유전자를 이용한 육종된 균주의 사용만을 허가하고 있는 실정이다. 그리고 근래의 생물산업은 공업적인 물질생산을 위해서는 유전자재조합법을 응용하여 주로 실험실균주를 이용하고 있으며 실용효모는 주로 식품양조산업에 국한되어지고 있다.

그러면 유전자의 도입이나 염색체유전자의 조작에 의한 육종이 아닌 성적인 교잡에 의한 육종이 가능한가. 위에서 언급한 바와 같이 실용효모는 일반적으로 배수체로 이루어져있어 여러가지 어려운 점이 있으나 접합능 혹은 포자형성능을 부여할 수 있다면 접합능을 지니는 균주나 감수분열분리주를 얻을 수 있어 성적교잡에 의한 잡종체를 형성시킬 수 있다. 이는 유전자조작에 의해서는 특정목적물질의 대량생산용 균주의 육종이 가능하나 성적교잡에 의한 육종에서는 교잡의 조합에 의하여 보다 다종다양한 균주의 취득이 가능하여 폭넓은 육종이 가능할 수 있다.

한편, 최근의 생물산업에서 재조합DNA기술-유전자공학-을 이용한 유용물질의 생산은 중요한 위치를 점하고 있다. 그 중에서 특히 대장균, *Escherichia coli*의 역할에 대해서는 언급할 필요도 없지만 여기에서 만들어지는 단백질의 processing이나 수식-특정부위에서의 절단이나 당쇄의 부과-등에 관련하여 그 능력에 한계가 명확하여 물질생산에는 자연적으로 동물세포배양이나 다른 숙주세포계를 요구하게 되었다. 그 중에서 효모는 단세포의 진핵세포로 유용물질생산용 숙주로서의 장점을 나타낸다. 즉, 가) 유전학적인 지식의 확립과 더불어 영양요구성, 내성

선택부호의 다양성, 나) 형질전환법에 의한 이종 유전자의 도입용이, 다) 동물세포에서는 곤란한 다양한 유용변이주의 분리가능, 라) 진핵세포의 특성-원핵세포와 상이한 전사조절계, splicing기구, 당쇄부가기능 등, 마) 세포막계가 발달하여 생산단백질의 분비가 용이하다. 이러한 점들에 더하여 효모의 균주배양이 일반세균류와 같이 공업용배지로 대량배양이 가능하다는 점을 들 수 있다. 그리고 나아가 분자생물학적인 지식의 발전으로 효모를 숙주로 한 다양한 벡터시스템의 개발로 인하여 예를 들어 논할 필요조차 없을 정도로 이종세포에서 클론화된 유전자를 이용한 다양한 유용물질의 생산이 가능하게 되어 있다.

여기에서는 그 우수성이 인정되나 특성상 균주개량이 곤란한 것으로 알려진 양조용 실용효모의 육종방법을 분자유전학적인 방법을 이용한 가능성을 논한다. 나아가 근래 본실험실에서 인간의 라이소자임의 대량생산을 위하여 화학적으로 합성한 인간라이소자임유전자를 실험실효모의 숙주·벡터시스템을 이용하여 공업적인 생산이 가능하도록 유전공학적으로 효모를 육종한 방법에 대하여 소개하고자 한다. 이러한 육종방법은 향후의 효모를 도구로 하여 물질생산의 개선이나 신물질의 대량생산을 위한 하나의 모델이 될 수 있을 것으로 기대한다.

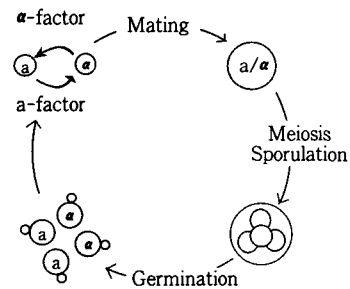
## II. 실용효모의 분자유종기술의 개발

실용효모를 유전자의 도입이나 염색체유전자의 조작에 의한 육종이 아닌 성적인 교잡에 의한 육종에 대한 예를 여기에서 들기로 한다. 실용효모는 일반적으로 배수체로 이루어져있어 외부로부터 접합능 혹은 포자형성능이 부여된다면 접합능을 지니는 균주나 감수분열분리주를 얻을 수 있어 성적교잡에 의한 잡종체를 형성시

킬 수 있다.

*S. cerevisiae*의 반수체 heterothallism균주는 a 또는  $\alpha$ 의 2종류가 있다. a세포는  $\alpha$ 세포와 접합하여 a/a 이배체세포를 형성한다. 이배체세포는 접합능은 없지만 영양이 부족한 기아조건이 되면 포자를 형성한다. 포자낭에는 a 또는  $\alpha$ 의 접합능을 지니는 4개의 포자가 만들어지며 적절한 영양조건이 갖추어지면 발아하여 반수체세포로 증식한다[그림 1]. 이러한 유성생활환을 이용하여 상이한 접합능을 지닌 균주간의 교잡을 통하여 육종이 가능하다.

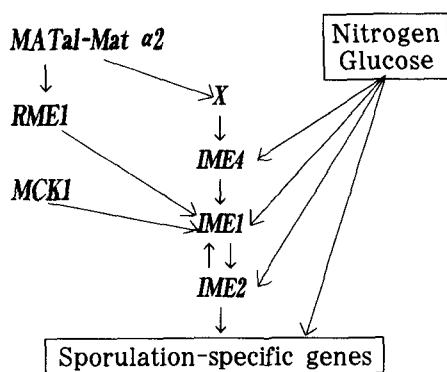
효모의 포자형성에는 최소한 두가지의 조건이 필요하다. 한가지는 a/a 세포(접합형 유전정보)이며 나머지는 영양원의 결핍(탄소원 및 질소원의 결핍)상태에 있어야 할 것(영양원 정보)이다 (Malone, 1990).



[그림 1] 효모, *S. Cerevisiae*의 생활사

a세포와  $\alpha$ 세포는 성적교잡을 위하여 상대세포에 의하여 인식되는 페로몬, mating factor를 분비한다. Mating factor에 대한 반응으로 세포는 분열주기, G1에서 분열을 멈춘다: 계속하여 생화학적 형태적인 변화와 더불어 a세포와  $\alpha$ 세포끼리의 융합이 정점에 이르고 배수체인 a/a 세포가 된다. a/a 이배체는 mating factor를 만들 수도 그리고 여기에 반응할 수도 없으나 영양결핍이 되면 자낭포자를 형성하고 각 자낭에는 네개의 반수 체포자가 형성된다. 이들 포자는 영양분이 공급되면 정상적으로 증식할 수 있다.』

[그림 2]에서 보는 바와같이  $a/\alpha$  세포에서는 포자형성을 억제하기 위하여 작용하는 *RME1* (Mitchell and Herskowitz, 1986) 유전자의 전사가  $a1-$   $\alpha2$ 에 의하여 억제된다. 결과로 포자형성을 촉진하는 *IME1* 유전자(Kassir et al., 1988)가 발현하여 *IME1* 유전자가 *IME2* 유전자 (Smith and Mitchell, 1989)와 하류의 포자형성에 필요한 유전자군의 발현을 촉진한다 (Mitchell et al., 1990). 그리고 *IME2* 유전자는 이들 포자형성에 특이적인 유전자군의 전사 유도에 관여함과 동시에 *IME1* 유전자의 전사를



[그림 2] 효모에서의 감수분열의 조절

『유전자 *IME1*의 산물은 유전자 *IME2*의 발현에 요구된다. 그리고 *IME2*의 산물은 포자형성 특이유전자군(Sporulation specific genes)의 발현에 필요하며 *IME1*의 발현을 억제한다. 나아가 *IME1*의 산물은 *IME2*의 작용이 없을 때 포자형성 특이유전자군의 발현을 촉진하고 유전자 *RME1*의 산물은 *IME1*의 발현을 억제한다. 유전자 *MAT*의 산물,  $a1$ 과  $a2$ 는 *RME1*의 발현을 억제하고 나아가 *IME1*의 발현을 *IME4*를 통하여 촉진한다. *MCK1*산물은 *IME1* 유전자의 충분한 발현을 위하여 필요하다. 질소화합물과 포도당은 *IME1*과 *IME2*, *IME4*, 포자형성 특이유전자군의 발현을 억제한다. 여기서 “X”는 *IME4*의 발현을 억제하는 유전자로 추정된다 (shah and Clancy, 1992).』

feedback제어한다 (Smith and Mitchell, 1989). 그리고 자낭의 성숙에 관여하며 proteinkinase와 상동성 단백질을 만드는 *MCK1* 유전자(Neugeborn and Mitchell, 1991)도 *IME1* 유전자의 전사를 유도하고 있다.  $a/\alpha$  세포에서만 그 전사가 확인되는 *IME4* 유전자도 *IME1* 유전자의 전사에 필요하다 (Shah and Clancy, 1992). 영양원의 정보가 어떠한 메커니즘을 통하여 포자형성에 필요한 유전자군에 전달되는지는 명확하지 않지만 직접 *IME1*, *IME4* 유전자 및 포자형성 특이적 유전자군에 전달되는 것으로 보고되고 있다 (Yoshida et al., 1990; Ki-hara et al., 1991; Shah and Clancy, 1992).

#### 1. 실용효모에서 접합능을 보이는 균주의 분리

실용효모는 일반적으로 이배체 이상의 배수체 (Emeis, 1961; Kitamoto et al., 1990)이며 접합능을 지니고 있지 않기 때문에 교잡에 의한 육종이 곤란하다. 지금까지 실용효모로 부터 접합형을 지니는 균주의 분리방법은 random 포자분리나 열처리법이 사용되었다 (大内 and 秋山, 1976, 淺野 et al., 1987). 그렇지만 이러한 방법들은 상당한 숙련과 경험을 필요로 한다. 그리하여 실용효모로 부터 접합능을 지니는 균주의 간단한 분리방법을 개발하기 위하여 일본양조협회의 협회7호를 이용하여 가능성을 조사하였다 (Nakazawa et al., 1994). 협회7호는 일본양조협회의 대표적인 실용효모로 현재 일본주류제조업체는 대부분이 본 균주를 개량하여 사용하고 있다. 실용효모인 협회7호의 정상적인 접합형제어기구가 작용하는가는 유전자의 해석 및 유전자산물의 확인을 통하여 밝혀졌다. 그리하여 접합형 유전정보는 구조적으로나 기능적으로 정상적인  $a/\alpha$  균주와 동일한 것으로 알려져 본 균주로 부터  $a$  혹은  $\alpha$  세포의 분리를 시도하였다.

협회7호의 균주에 a세포 혹은  $\alpha$ 세포일때 각각 특이적으로 염색되는 방법(Hwang et al., 1988)을 이용하여 변이체 EMS처리를 하여 약 50,000주의 콜로니로부터 a형과  $\alpha$ 형을 나타내는 각각의 다섯균주를 분리하였다. 이들 a형과  $\alpha$ 형균주사이의 교잡체를 조성하여 포자형성능을 조사하였다. 그러나 모든 교잡체에서 포자형성은 보이지 않았다. 그리하여 [그림 2]에서 나타낸 바와같이 포자형성에 직접적으로 관련될 것으로 예상되는 IME1유전자를 G418약제내성을 이용한 플라스미드상태로 이들 교잡체에 도입하여 과잉발현을 시켜보았다 (Nakazawa et al., 1992). 얻어진 형질전환체에서 포자형성능을 조사한 바 약간의 포자가 관찰되었으며 이들 포자를 분리하여 영양배지상에서 배양하였으나 정상적인 발아능은 보이지 않았으며 결국 감수분열 분리체는 분리되지않았다.

## 2. 청주양조용효모로부터 접합능을 보이는 균주의 분리

협회7호로부터 접합능을 나타내는 균주의 분리가 가능한 것으로 보아 다른 청주용 효모로부터도 역시 이러한 방법의 적용이 가능할 것으로 예상된다. Nakazawa등(1994)의 실험 결과를 소개하면 일본의 小西주조주식회사에서 고급청주제조용으로 이용되는 K균주와 S균주를 각각 사용하였다. K균주는 저온에 강하나 발효중 거품생성도가 높으며 S주는 향기생성도가 좋으나 저온에서 발효가 늦은 점이 단점이다. 이러한 결점을 지닌 양균주를 교잡하여 저온에 강하며 거품생성도를 억제하고 좋은 향기를 얻을 수 있는 균주의 육종을 시도하였다. K균주와 S균주에 대하여 먼저 접합능을 조사한 바 어느쪽도 일반적인 실용효모와 마찬가지로 접합능은 없었다. 그리고 접합형 유전정보에 관한 구조해석의 결과 각각 a/ $\alpha$ 이거나 a/a,  $\alpha$ / $\alpha$

인 것을 알 수 있었다. 이들 균주에서 협회7호와 동일 방법으로 콜로니염색법(Hwang et al., 1988)을 이용하여 a 또는  $\alpha$ 형을 보이는 세포를 분리하였다. 단, 협회7호의 경우에는 돌연변이유도제 EMS를 처리하였으나 본 실용효모의 경우 우수성질의 손상을 막기위하여 자연 돌연변이체를 회수하였다. 확인시험을 거쳐 K균주로부터는 a형을 보이는 5클론을 분리하였으며, S균주로부터는  $\alpha$ 형을 보이는 1클론이 분리되었다. 이들 분리된 각각의 a 및  $\alpha$ 균주의 교잡을 시도하여 5주의 교잡체를 만들었다. 이들 교잡체를 이용하여 발효시험을 한 결과 향기의 주성분중의 하나인 ethyl caprate가 친주의 1.5배의 생성능을 보이는 교잡체에 대하여 소량의 주조실험을 하였다. 그 결과 맑고 깨끗하며 향기가 높은 청주가 제조되었으며 발효속생기간 중에도 거품생성도가 그다지 높지않은 것을 알 수 있었다.

## 3. 맺은말

상기의 내용과 같이 높은 배수체를 형성하는 실용효모를 육종하기위하여 접합능을 부여하여 협회7호와 같은 실용효모에서 접합능을 보이는 균주의 분리가 가능하였다. 이러한 기술을 이용하여 실제 생산라인에서 이용되고있는 청주주조용효모, K주 및 S주를 이용하여 접합능을 나타내는 균주의 분리가 가능하였다. 이들 분리균주를 이용하여 새로운 교잡체를 형성하여 성질을 조사한 바 친주에서 보이는 우수형질을 나타내는 새로운 효모의 육종방법이 가능하였다. 이후 유전자적인 재조합을 이용하지않고 이 방법을 이용하여 실용효모의 육종의 진전을 가져올 수 있으리라 기대된다.

## III. 효모의 유용단백질 생산기술의 개발

상기의 장에서는 그 육종이 곤란시되어온 실용효모를 분자유전학적인 방법을 이용하여 접합능을 부여하고 나아가 이들 효모를 이용하여 교잡에 의하여 친주로 부터 우수한 형질을 지닌 효모의 육종가능성에 대하여 논하였다. 본장에서는 최근의 분자생물학적인 지식을 응용하여 유전자조작을 통하여 새로운 형질을 지닌 효모를 육종하여 산업적으로 유용한 물질을 공업적인 생산가능성에 대하여 논하고자 한다.

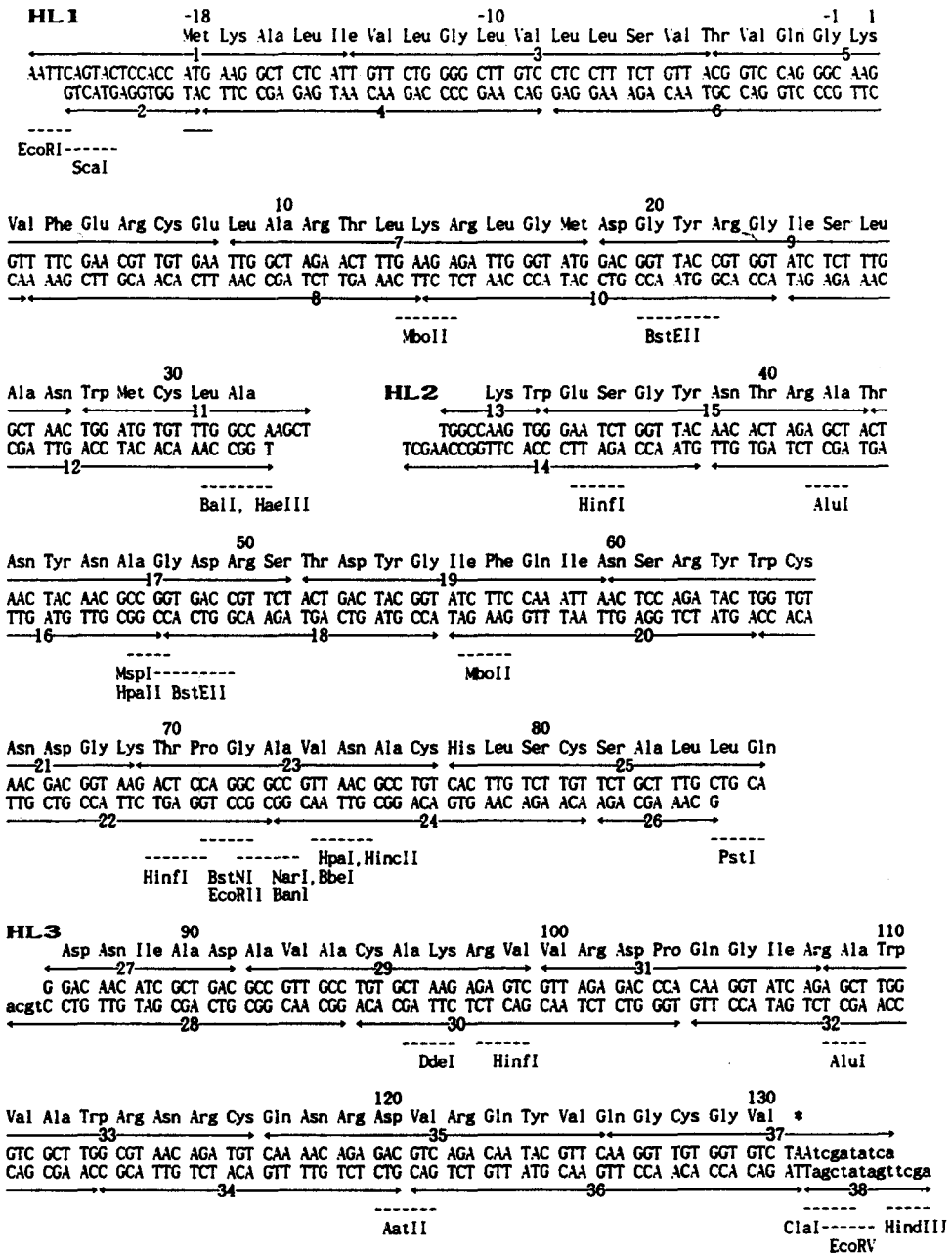
재조합DNA 기술이 정비되어 유전자공학의 추진기반이 갖추어진 것은 약 15,6년이전 부터로 이후 유전자의 구조와 기능, 발현과 조절기구에 대한 연구가 급속하게 증가되어왔다. 또한 이기간 동안 유전자의 생합성과 기본구조에 대한 분자적인 지식이 축적되고 나아가 유전정보의 발현을 지배하는 생물의 기본메카니즘이 조금씩 밝혀져왔다. 이러한 지식들, 유전자공학과 세포공학, 단백질공학의 새로운 기술을 받아들인 오늘날의 생물학은 이러한 기술들의 적용범위를 고등생물에 까지 확대시키게 되었다.

대장균과 효모는 단세포생물로서의 범위를 벗어나 기초생물학의 최적의 실험재료로 등장하면서 대장균에서 축적된 지식, 특히 숙주·벡터 시스템이 그대로 효모에 까지 적용가능하게 되었다. 특히 진핵세포로서 세포체계를 갖춘 효모는 고등생물세포와 동일한 보편적인 세포내 구조와 유전정보 발현조절기구가 갖추어져 있음을 알 수 있게 되었다.

이종유전자의 도입에 의한 유용단백질의 대량생산이 대장균보다도 우수한 것으로 밝혀진 효모는 특히, 의학이 세포생물학적인 지식과 접하면서 고등생물의 생리활성단백질의 대량생산의 요구와 더불어 이러한 요구가 효모의 숙주·벡터시스템에 의하여 가능성이 실현되기 시작하였다. 대표적인 예로 간염백신을 위한 바이러스의 표면항원의 대량생산을 들 수 있으며 나머지 예는 생략한다.

본인의 연구실에서는 3년전부터 효모를 이용한 이상적인 물질생산시스템의 구축을 목적으로 생산물을 인간 라이소자임의 생산용 숙주·벡터 시스템의 제조를 시도하였다. 여기에 결과의 일부를 소개한다.

다당체 분해효소로서 보편적으로 알려져있는 라이소자임[EC 3,2,1,17]은 1909년 Laschtschenko에 의해 닭의 난백 라이소자임(이하 CLY)이 세균을 용균시키는 작용이 발표된 이후 여러 연구를 거쳐 현재 소멸제로 폭넓게 이용되고있다. 한편 130개의 아미노산으로 이루어진 인간의 라이소자임(이하 HLY)은 CLY와는 DNA염기 및 아미노산배열상 각각 60.1%, 56.8%의 높은 상동성을 보인다 (Yoshimura et al., 1988). 그리고 HLY는 CLY와 비교할 때 용균활성이 3-4배 높으며 다형핵백혈구에 의한 세포의 식작용촉진, 면역거동의 일치, 근육및 정맥주사가능등 그 뛰어난 효과를 기대할 수 있다. 미생물을 이용한 라이소자임의 생산은 대장균이나 *B. subtilis*를 이용한 경우 세포내에서 불용성 내지 불활성 단백질의 형태로 얻어졌다 (Yoshimura et al., 1987). 그렇지만 효모의 경우 세포외 분비용 signal peptide를 chicken 내지는 효모의  $\alpha$ -factor의 것을 이용하여 정상적으로 생산되었다 (Jigami et al., 1986; Castanon et al., 1988). 그리고 현재 HLY의 cDNA 염기배열 및 아미노산배열은 완전히 밝혀져있으므로 이러한 지식을 바탕으로 효모에서 단백질생성을 높이기위하여 고빈도의 유전자 codon(Bennetzen and Hall, 1982)을 채용한 화학합성법으로 새로운 HLY유전자를 제조하였다. 그리고 생산된 HLY의 정제의 간편성을 고려하고 분비효율을 높이기위한 분비용signal peptide는 HLY 본래의 염기배열을 합성유전자 앞부분에 연결하여 발현과 더불어 효모세포외로 분비되게 하였다. 이렇게 만들어진 HLY유전자를 copy가 다양한 생산용벡터를 제조하여 배양



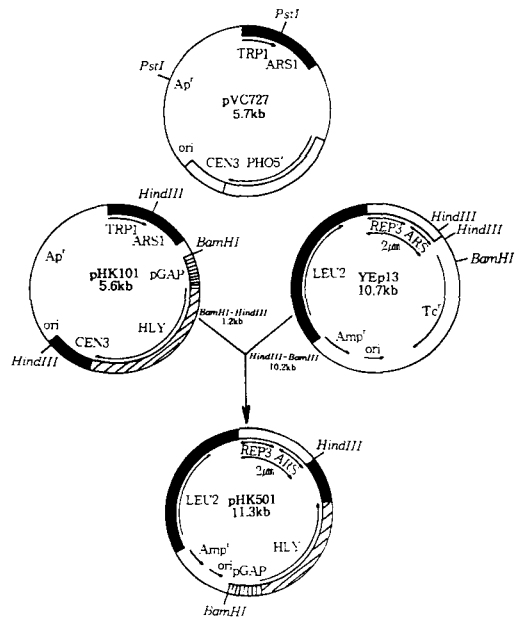
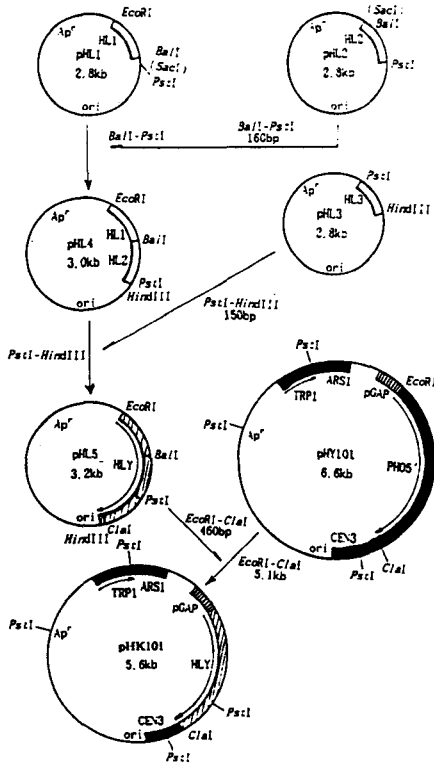
[그림 3] 합성 인간라이소자임 유전자의 염기배열과 제한효소부위  
 『HLY 유전자는 HL1, HL2, HL3의 세개의 단편으로 합성된다. 화살표와 함께 번호로 표시된 것은 합성을 위한 DNA oligomer를 나타내고 있다. 각 제한효소부위는 밑줄로 표시되어 있다.』

조건에 따른 생산성을 검토하였다. 나아가, 생산성 향상을 위하여 다양한 벡터계의 제조와 함께 배양최적화를 위하여 고밀도배양, 분비를 촉진시키기 위한 배양중의 pH변화, 고정화 미생물의 이용 등 다양한 방법으로 대량생산화를 추진하고 있다.

1. 합성 HLY 생산용 벡터의 제작

목적으로 하는 유전자를 효과적으로 발현시키기 위하여 최소한 다섯가지의 요인을 생각할 수

있다. 첫째, 산물에 따른 즉, 숙주의 생육에 저해요인이 없다면 강력한 promoter를 사용할 것, 둘째, 전사산물의 안정성을 높이기위하여 효율적인 terminator를 이용할 것, 셋째, 벡터의 copy 수를 고려할 것, 넷째, 숙주로 이용되는 미생물의 유전적인 배경을 고려할 것, 마지막으로 산물의 정제간편성을 위하여 세포외로의 분비 등을 들 수 있다. 이에 입각하여 먼저 promoter로는 당대사계에 간여하며 강력한 것으로 분류되는 glyceraldehyde 3-phosphate탈수소효소를 생산하는 GAP유전자의 promoter를 이용하였다 (Hwang et al., 1991). terminator로는 인산대사계의 PHO5유전자의 terminator로 이미 그 효율성이 입증되어져있다. 벡터의 copy수에 관하여는 효모염색체의 동원체를 이용한 저copy



[그림 4] 인간라이소자임 발현벡터, pHK101의 제작

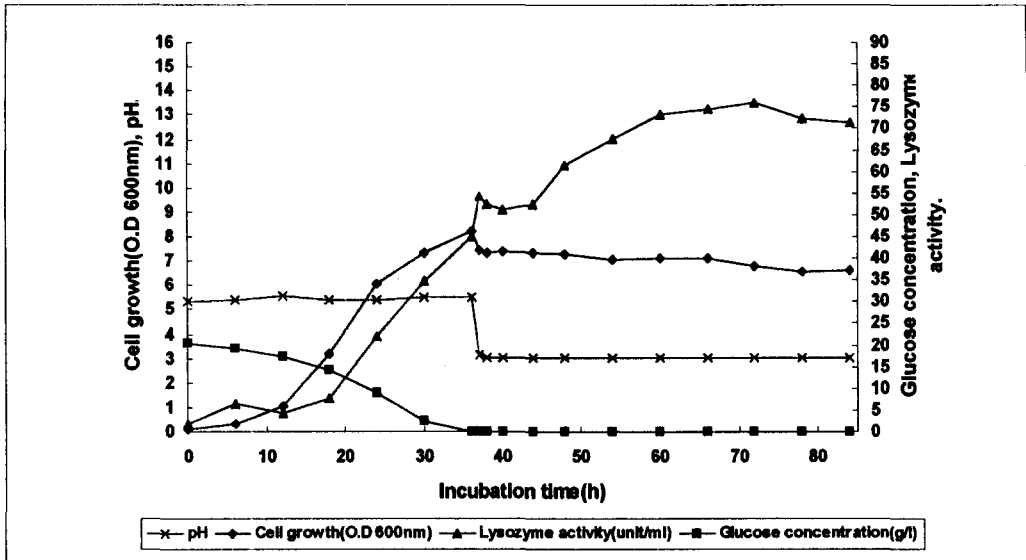
『화살표는 제작순서를 나타내며, 벡터내의 pGAP, HLY는 각각 GAP promoter와 인간라이소자임의 유전자를 표시한다.』

[그림 5] 효모의 2μ 플라스미드를 이용한

다copy수의 HLY 발현벡터, pHK501의 제작

『REP3와 ARS는 2μ플라스미드에서 유래되었으며 그 이외의 것은 [그림 4]와 동일하다.』





[그림 6]

## 회분배양에서 pH전환에 따른 HLY의 수율향상

수 벡터(1-2개)와 2 $\mu$  플라스미드의 복제기점을 이용한 고copy 수 벡터(100개이상)의 두종류의 발현용 벡터를 제작하여 생산량을 측정하였다. HLY 유전자를 인공적으로 합성하기 위하여 Fig. 3에서 나타내는 바와같이 분비 signal peptide를 포함하는 전단백질 code부분을 세부적으로 나누어 38개의 10-33mer에 이르는 oligomer를 합성하였다. 이를 먼저 크게 세부분으로(1-12, 13-26, 27-38) 나누어 단편 HL1, 2, 3으로 조립하였다. Fig. 4에서 보는 바와같이 이들 단편을 플라스미드 pUC12를 이용한 벡터 pHL1, 2, 3을 만들어 이들을 연결한 pHL5를 제작하였다.

이를 GAP promoter와 PHO5 terminator 사이에 위치하게 하여 저copy 수의 발현용 벡터 pHK101을 제작하였다. 나아가 2 $\mu$  플라스미드의 복제기점을 이용한 고copy 수 발현용 벡터는 [그림 5]에서 보는 바와같이 HLY 유전자 단편을 분리하여 새로이 연결시키는 방법으로 제조되었다.

## 2. 효모에서의 라이소자임 생산

상기의 제작과정을 통하여 얻어진 각각의 벡터를 효모에 도입하여 배양액 중에 얻어지는 라이소자임의 생산량을 조사하였다. 합성배지를 이용하여 플라스크배양시 경과시간중의 최고생산량은 Table 2의 pHK101의 경우 배양 7시간째에 ml당 7unit로 나왔으며, pHK501의 경우 배양 81시간째에 ml당 55.1unit로 최고치에 도달하였다. lysozyme의 생산을 상기의 결과를 토대로 여러가지 조건에서 검토하였다. 결과만을 간단하게 기술하면 promoter의 특성상 균체생육과 동조하여 생산되며 균체내에서 발현된 lysozyme은 배양액중에 최고로 분비되는 시점은 효모에 의하여 유기산의 생산이 최고치에 이르고 탄소원이 고갈되며 균체증식이 정지기에 돌입하였을 때이며 이때의 배양액 중의 pH가 3-4부근에서 최대의 축적량을 보임을 알 수 있

었다. 이를 조절하여 생산량의 증대를 위하여 배양중의 pH를 5.5에서 유지한 후 탄소원이 고갈되는 36시간째 부근에서 pH를 3.5부근으로 조정하여 축적되는 양을 조사한 바 배양 72시간째에 최대축적량인 ml당 72unit를 생산하였다 [그림 6].

현재 숙주·벡터시스템을 새로이 구축중에 있으며, 생산량의 증대를 위하여 다양한 배양조건, pH shift, 고정화세포의 이용, 세포재순환방식 등을 검토중에 있다.

### 3. 맺은말

기존의 생명공학기술은 자연발생적인 미생물들로 부터 기능적으로 유효한 물질생산이 가능한 미생물을 선별하여 이들 미생물이 지니고 있는 생리에 변화를 주어 원하는 물질을 배양기술

을 통하여 제조하는 것이라할 수 있다. 그렇지만 새로운 생명공학은 이미 존재하는 기능성 단백질을 유전자조작 혹은 유전공학적인 방법을 응용하여 단백질 그 자체의 기능향상 또는 복합 기능단백질로 유전자단계에서 제조한다. 그리고 이들 재조합된 유전자를 이용하여 종의 벽을 초월하여 새로운 미생물체를 탄생시켜 다양한 배양기술을 응용하여 대량생산이 가능한 새로운 생산체계를 확립시킬 수 있다는 가능성을 의미한다.

본고의 후반부는 효모를 숙주로 이용하여 화학적으로 합성된 유전자인 *HLV*의 대량발현 생산계의 확립은 발현용 벡터계의 제작과 더불어 세포내 고발현의 유도과 세포외로의 분비기구 도입 등 일련의 효모육종 개량기술을 동반한다. 이는 세부적으로 나누면 첫째, 기능단백질 생산을 위한 구조유전자의 조작기술을 확립할 수 있

<표 1> 협회7호균주에서의 융합유전자의 발현(Nakazawa ct. al., 1994)

| Strain<br>(Mating type) | Phosphatase activity(mU/OD <sub>660</sub> ) |                                |                                |
|-------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|
|                         | <i>MATa/p-PH05</i>                          | <i>STE6p-PH05<sup>a)</sup></i> | <i>MFa/p-PH05<sup>b)</sup></i> |
| SH1089 (a)              | 20.4  | 21.1                           | 6.7                            |
| SH1091 (a)              | 33.5  | 0.1                            | 8.8                            |
| SH2424 (a/a)            | 0.5   | 0.2                            | 0.3                            |
| K7 (Non)                | 0.3   | 0.6                            | 1.4                            |

a), b) 는 각각 a형 효모와 a형 효모에서만 발현하는 a 또는 a 특이적인 유전자이다.

<표 2> 형질전환된 효모가 생산한 인간라이소자임의 활성

|                                  | pVC727 | pHK101 | pHK501 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|
| Human lysozyme activity(Unit/ml) | 2.8    | 7.0    | 55.1   |

- 수치는 중복실험치를 평균한 값임.
- 최고활성에 도달한 배양시간 : pVC727와 pHK101; 7시간, pHK501; 81시간

다. 둘째, 적절한 promoter, terminator, 발현용 벡터의 copy 수의 조절을 통하여 일관된 발현계를 확립할 수 있다. 셋째, 유전자조작된 미생물을 이용하여 대량생산을 위한 배양최적화-벡터의 안정성, 균체의 고밀도배양, 분비촉진을 위한 배양중의 pH 변화, 고정화균체의 이용 등을 검토하여 산업적으로 이용가능한 대량생산 배양모델을 확립할 수 있다.

### 【참고문헌】

1. 浅野眞一, 久安智香, 山抱基純, 森村 茂, 安本眞希男, 木田建次. 1987. 凝集性酵母の育種と育種株の發酵特性. 醸酵工學會誌 65: 169-177.
2. Bennetzen, J.L. and B.D. Hall. 1982. Codon selection in yeast. J. Biol. Chem. 257: 3026-3031.
3. Castanon, M. J., W. Spevak, G.R. Ad-olf, E.C. Sledziewska, and A. Sledziewski. 1988. Cloning of human lysozyme gene and expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 66: 223-234.
4. 大内弘造, 秋山裕一. 1976. 反復戻し交配による優良 killer 清酒酵母の造成. 醸酵工學會誌 54: 615-623.
5. Emeis, C.C. 1961. Polyploide Kulturhefen. *Proc. Europ. Brew. Conv., Proc. 8th Congr., Vienna*, 205-215.
6. Fogel, S. and J.W. Welch. 1982. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 5342-5346
7. Hirata, D. and T. Hiroi. 1991. Gene that cause overproduction of isoamyl alcohol by increased gene-dosage effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 919-942.
8. Hwang, Y.I., S. Harashima, and Y. Oshima. 1988. Construction of a promoter-probe vector with the *PHO5* gene encoding repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:155-159.
9. Hwang, Y.I., A. R. Seo., S. K. Shim and D. H. Chung. 1991. Construction of an expression vector system with the *GAP* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 568-574.
10. Jigami, Y., M. Muraki, N. Harada, and H. Tanaka. 1986. Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene* 43: 273-279.
11. Jimenez, A. and J. Davies. 1980. Expression of transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* 287: 869-871
12. Kassir, Y., D. Granot, and G. Simchen. 1988. *IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 52: 853-862
13. Kihara, K., M. Nakamura, R. Akada, and I. Yamashita. 1991. Positive and-negative elements upstream of the-meiosis-specific glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 383-392
14. Kitamoto, K., K. Oda, K. Gomi, and K. Takahashi. 1990. Construction of

- uracil and tryptophan auxotrophic mutants from sake yeast by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2927-2987.
15. Malone, R. E. 1990. Dual regulation of meiosis in yeast. *Cell* **61**: 375-378.
16. Mitchell, A. P., S. Driscoll, and H. E. Smith. 1990. Positive control of sporulation-specific genes by the *IME1* and *IME2* products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2104-2110.
17. Nakazawa, N., K. Tsuchihara, T. Hattori, K. Akita, S. Harashima, and Y. Oshima. 1994. A method for direct selection of mating-competent clones from mating-incompetent industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **78** : 6-11.
18. Nakanawa, N., T. Ashikari, N. Goto, T. Amachi, R. Nakajima, S. Harashima, and Y. Oshima. 1992. Partial restoration of sporulation defect in sake yeasts, Kyokai no. 7 and no. 9, by increased dosage of the *IME1* gene. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 265-270.
19. Neigeborn, L. and A. P. Mitchell. 1991. The yeast *MCK1* gene encodes a protein kinase homolog that activates early meiosis gene expression. *Genes Dev.* **5**: 533-548.
20. 小田佳緒子, 北本勝ひこ, 高橋康次朗, 吉澤淑, 1988. 醸造用酵母からリジン要求性変異株の単離. 日本醸造協会 **83**: 614-617.
21. 坂井和久. 1987. グルコアミラーゼ遺伝子を組込んだ高発酵性ビール酵母の育種. 発酵と工業 **45**: 569-578.
22. Shah, J. C. and M. Clancy. 1992. *IME4*, a gene that mediates *MAT* and nutritional control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1078-1086.
23. Smith, H. E. and A. P. Mitchell. 1989. A transcriptional cascade governs entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2142-2152.
24. Sone, H., T. Fujita, K. Kondo, F. Shimazu, J. Tanaka, and T. Inoue. 1988. Nucleotide sequence and expression of the *Enterobacter aerogenes*  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase gene in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 38-42.
25. Suizu, T., Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, K. Yoshizawa, and G. Tamura. 1990. Construction of urea non-producing yeast *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *CARI* gene. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 537-539.
26. 手塚秀敏. 1990. 醸造におけるバイオテクノロジー. 産調出版: 82
27. Watari, J., Y. Tanaka, M. Ogawa, J. Murakami, and S. Koshino. 1991. Breeding of flocculent industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains by introducing the flocculation gene *FLO1*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1547-1552.
28. Yoshimura, K., A. Toibana, and K. Nakahama. 1988. Human Lysozyme Sequencing of a cDNA, and Expression and Secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 794-801.
29. Yoshimura, K., A. Toibana, K. Kikuchi, M. Kobayashi, T. Hayakawa, K.

- Nakahama, M. Kikuchi, and M. Ikehara. 1987. Differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus Subtilis* in Secretion of Human Lysozyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**: 712-718.
30. Yoshida, M.,H. Kawaguchi, Y. Sakata, K. Kominami, M. Hirano, H. Shima, R.Akada, and I. Yamashita. 1990. Initiation of meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* requires a novel protein kinase homologue. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 176-186

眞廉無廉名. 立名者正所以爲貪. 大巧無巧術, 用術者乃所以爲拙.

진짜 청렴에는 청렴하다는 이름조차 없다. 그러므로, 이름을 날리는 사람은 바로 탐욕스럽기 때문이다. 참으로 뛰어난 재주에는 교묘한 재주가 없다. 그러므로, 교묘한 재주를 부리는 사람은 바로 재주가 서툴기 때문이다.

- 菜根譚중에서 -