

생물공학기법에 의한 새로운 미생물제제의 개발

최윤재 교수

서울대 동물자원과학과

연사약력

- 1973 ~ 1980 서울대학교 농과대학 축산학과 축산학 학사
- 1981 ~ 1983 서울대학교 대학교 축산학과 축산학 석사
- 1984 ~ 1987 미국 North Dakota 주립대학 축산생물공학 박사
- 1987 ~ 현재 서울대학교 농생대 동물자원과학과 교수
- 1993 ~ 1994 미국 Cornell 대학교 Visiting professor
- 1995 ~ 현재 농림기술관리센터전문위원
- 1997 ~ 1998 한국축산학회 학술위원장
- 1997 ~ 현재 농촌진흥청 축산기술연구소 겸임연구원
- 1998 ~ 현재 한국과학기술한림원 정회원
- 2000 ~ 현재 한국동물자원과학회 상무이사

생물공학기법에 의한 새로운 미생물제제의 개발

최 윤 재 / 서울대 동물자원학과 교수

◎ 친환경 사료의 개발

- 1) 분 배설량의 감소 — Cellulase, xylanase 분비 미생물제제의 개발
- 2) 분내 인 함량의 감소 — Phytase 분비 미생물제제의 개발
- 3) 분내 질소 함량의 감소 — 아미노산 균형, 적정 조단백질 급여

이 중 본 연구실에서는 1)과 2)를 이용 친환경 사료 개발에 역점을 두고 있다.

연구 I . Cellulase가 형질전환된 재조합 *Lactobacillus* sp. 균주의 개발 및 미생물제제로서의 이용성에 관한 연구(과기처 국책 과제)

1. 서 론

본 연구의 목적은 다양한 섬유소 분해 미생물들로부터 분리된 cellulase 유전자를 수집하여 그들의 효소학적 특성을 규명함과 동시에 유전자재조합 기법을 통해 장내 유익한 미생물인 *Lactobacillus* sp. 균주에 외래 cellulase 유전자를 형질전환시킴으로써 cellulase 분비능력을 갖는 새로운 재조합 *Lactobacillus* sp. 균주를 개발하고자 한다. 또한 이들 미생물들로부터 cellulase 유전자의 발현양상과 효소학적 특성을 규명하여 최종적으로 이러한 형질전환 *Lactobacillus* sp. 균주를 단위동물의 사료에 첨가하여 장관 내에 정착시킴

로써 균주자체가 갖는 생균제로서의 고유한 기능과 아울러 섬유소를 분해하는 새로운 생균제를 개발함으로써 궁극적으로 부존 사료의 효율적 이용을 통한 고품질의 축산물 생산과 나아가 고기능성 재조합 장내 미생물의 균주 육종과 유용대사산물을 생산하기 위한 대량생산체계 방법을 모색하고자 본 연구를 실시하였다.

2. 주요 연구내용

1) Cellulase 유전자의 수집 및 장내 단백질 분해효소에 저항성 있는 cellulase 선별

다양한 종류의 토양 및 반추미생물로부터 섬유소를 효율적으로 분해하는 cellulase 유전자로 *Clostridium thermocellum* celA(pCT104), *Fibrobacter succinogenes* S85 mixed glucanase(pJI 10), *Fibrobacter succinogenes* S85 CMC-xylanase(pCMC1), *Clostridium josui* celB (pJ2), *Actinomyces* KNG 40 Endo II(pCX1) 총 5개의 유전자를 확보하였으며 이들 유전자에서 유래한 산물인 cellulase로부터 장내 단백질 분해 효소에 대한 저항성을 조사하였다(Table 1). 그 결과 토양미생물인 *Clostridium thermocellum*에서 유래한 cel A의 endoglucanase가 단백질 분해효소인 pancreatin, trypsin, elastase에 대해서 각각 120, 110, 60분 이상의 효소 반감기를 유지하여 저항성이 가장 우수한 것으로 판명되어 본 연구의 대상 유전자로 이용하였다.

Table 1. Resistance of cellulases to proteolytic inactivation

Enzymes	Half life of enzyme incubated with proteinase(min)		
	Pancreatin	Trypsin	Elastase
Endoglucanase A	> 120	> 110	> 60
Endoglucanase II	30	20	15
Endoglucanase B	60	60	60
Mixed-glucanase	10	8	8
CMC-xylanase	5	6	5

2) *Lactobacillus* sp. 균주의 생리적 특성 조사

가축의 장내 유익한 균총을 형성하여 사료내 생균제로 널리 이용되는 유산균주인 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* 균주를 공시균주로 이용하였다. 이들 4균주들은 모두 생균제로서 갖추어야 할 중요한 기준인 내산성과 내담즙성이 우수한 균주로 판명되었다.

3) 재조합 cellulase 발현 벡터의 구축과 *Lactobacillus* sp. 균주로의 형질전환

2가지의 재조합 발현벡터를 구축하였다(Fig. 1). 우선 *Clostridium thermocellum* endoglucanase 유전자(ceI A) 중 자체 promoter를 보유한 3.2kb HindIII fragment를 *Lactobacillus* 발현벡터인 pNZ123에 삽입하여 재조합 발현벡터 pSD1을 구축하였고, 다음에 ceI A 유전자에서 자체 promoter 부분과 signal sequence를 제거하고 PCR로 증폭한 1.4kb Sal I fragment를 다른 *Lactobacillus* 발현벡터인 pNZ3004에 삽입하여 재조합 발현 벡터 pSD2를 구축하였고 이들 각각의 발현벡터를 형질전환에 이용하였다.

이들 재조합 발현벡터 pSD1, pSD2를 위에서 열거한 4가지의 *Lactobacillus* sp. 균주에 electroporator로 형질전환시켜 형질전환체를 얻는데 성공하였고 Congo red 염색법을 이용하여 cellulase activity를 확인하였다(Fig. 2, 3).

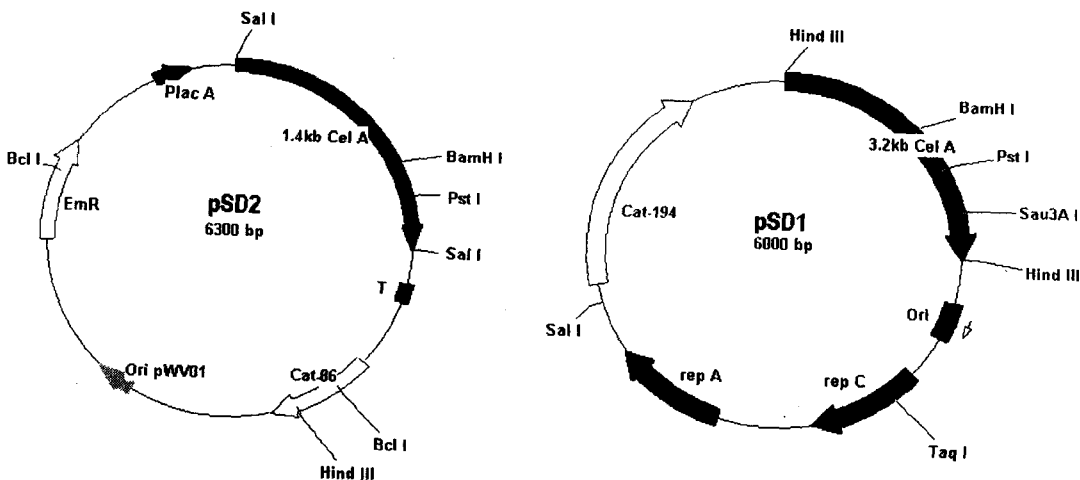
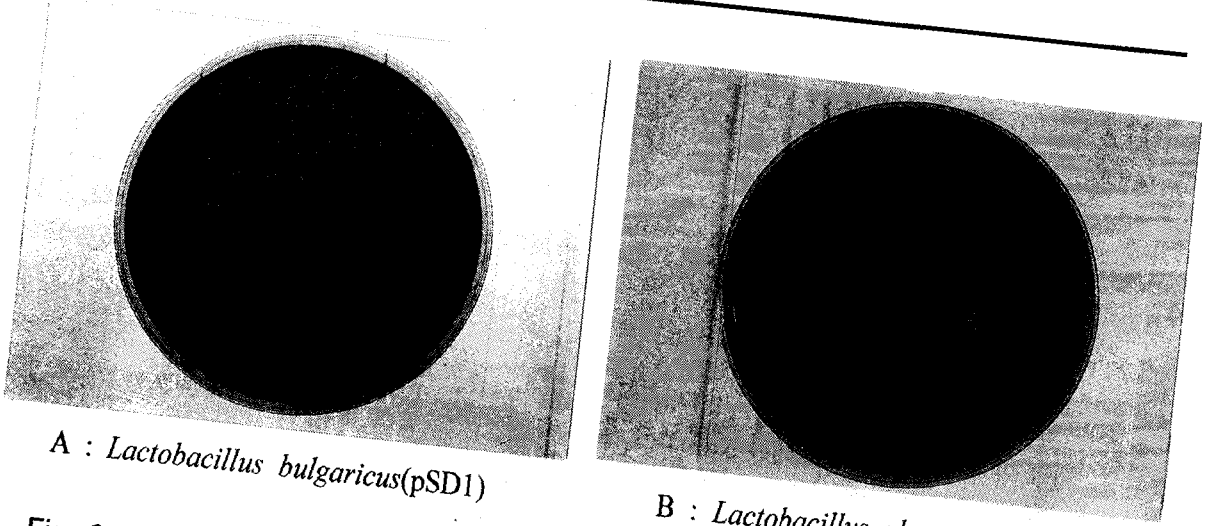


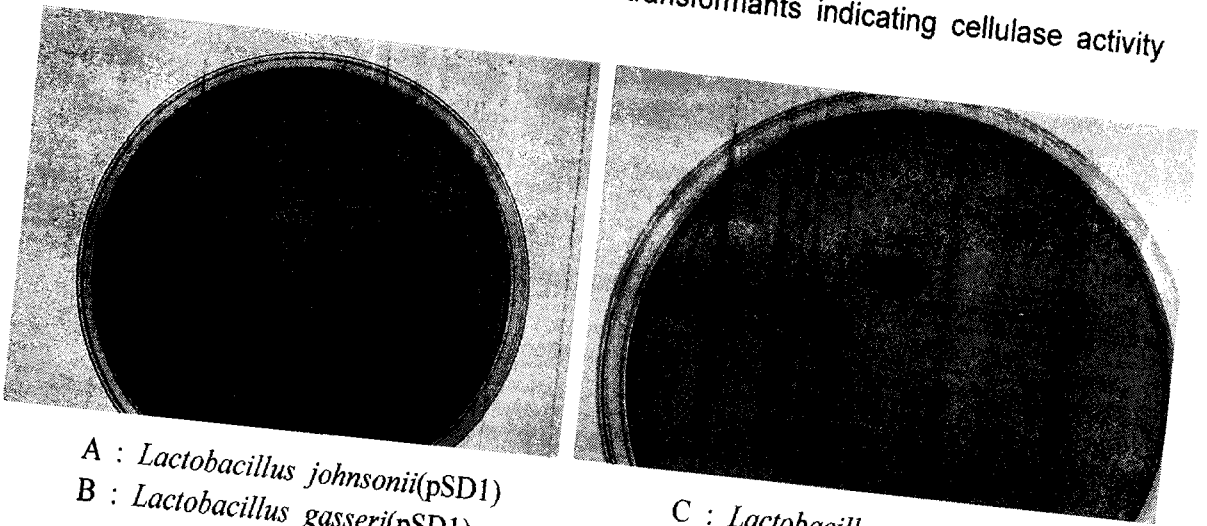
Fig. 1. *Lactobacillus* expression vector,



A : *Lactobacillus bulgaricus*(pSD1)

B : *Lactobacillus plantarum*(pSD1)

Fig. 2. Congo red test of *Lactobacillus* transformants indicating cellulase activity



A : *Lactobacillus johnsonii*(pSD1)

B : *Lactobacillus gasseri*(pSD1)

C : *Lactobacillus gasseri*(pSD2)

Fig. 3. Congo red test of *Lactobacillus* transformants indicating cellulase activity

4) 형질전환된 재조합 *Lactobacillus* sp. 균주의 효소학적 특성 규명

형질전환된 *Lactobacillus* sp. 균주의 정량적인 효소역가를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 특히 재조합 *Lactobacillus* sp. 균주로부터 생산된 cellulase의 대부분은 세포외로 분비됨을 알 수 있었고 효소의 최적온도는 60°C, 최적 pH는 5.5~6.0 이었다.

Table 2. The activity of endoglucanase in *Lactobacillus* transformants

Strain (Plasmid)	Secretion rate(%)	Endoglucanase activity(U/ml)		
		Total	Supernatent	Whole cell extract
<i>L. gasseri</i> (pSD1)	98.8	0.731	0.722	0.009
<i>L. gasseri</i> (pSD2)	87.7	0.464	0.407	0.057
<i>L. johnsonii</i> (pSD1)	95.7	0.793	0.759	0.034
<i>L. bulgaricus</i> (pSD1)	94.5	0.127	0.120	0.007
<i>L. plantarum</i> (pSD1)	91.7	0.157	0.144	0.013

3. 결 어

본 연구결과를 바탕으로 생물공학 기법을 이용한 cellulase를 효율적으로 분비하는 새로운 재조합 *Lactobacillus* sp. 생균제제를 개발하는 데 성공하였으며 그 파급효과로 향후 이러한 고기능성 생균제제를 가축의 사료첨가제로 이용할 경우, 가축의 소화불량 및 면역능력 개선, 사료효율 및 성장능력의 향상으로 고품질의 축산물 생산을 유도할 수 있으며 나아가 환경친화적인 저공해성 사료개발의 목적에 부합한다고 할 수 있겠다.

연구 II. 생물공학적 기법을 이용한 phytase 분비 미생물제제의 개발에 관한 연구

1. 서 론

축산폐수로 인한 환경 및 수질 오염 문제가 대두하고, 사료내 존재하는 20~30%의 유기태인 만을 이용하고 나머지는 모두 배설하기 때문에 환경오염의 주원인으로 작용하고 있으며, 낮은 인 이용을 때문에 사료내 값비싼 무기태인을 첨가해야 하는 문제점이 부각

되었다. 이러한 문제점 해결을 위해 사료내의 잠재적 오염원을 모두 이용할 수 있는 저 공해사료의 개발이 시급한 실정이다.

사료내 2/3 이상의 인이 phytate-P 상태로 존재하고 있으며, 이를 단위동물은 이용할 수 없으며, 이는 phytase의 결핍이 원인이며, 사료내에 존재하는 phytic acid를 phytase 효소를 첨가함으로써 가축이 이용할 수 있는 상태로 전변시켜야 할 필요성이 대두되었다. Phytase의 첨가로 인한 유기태인의 감소는 환경문제 해결에 좋은 돌파제로써 뿐만 아니라, 값 비싼 광물질의 대체물질로써의 역할을 충분히 담당할 것으로 사료된다. 본 연구는 토양으로 부터 phytase를 분비하는 미생물을 찾고 그 미생물로 부터 phytase 유전자를 cloning하고자 하며, phytase 효소를 대량생산하며, 또한 생균제로 이용하기 위하여 phytase를 효과적으로 생산하는 유산균 형질전환체를 제조하기 위하여, 유산균에서 최적의 발현 및 분비가 잘 되는 새로운 vector를 개발하기 위해 실시되었다.

2. 주요 연구내용

1) 토양 미생물에서 phytase 유전자의 cloning

① Phytase 분비 미생물의 분리

- (1) 목장 두과 목초 뿌리 근처의 토양 sample 이용
- (2) Trypton-yeast extract agar를 이용 희석 방법 이용
- (3) 제 1차 선발 : PSM agar medium 이용
- (4) 제 2차 선발 : PSS solution 사용
- (5) 마지막 선발 : Phytase 효소 역가 측정

② Phytase 분비 미생물의 동정

Phytase를 분비하는 bacteria를 두과식물 뿌리부근의 토양으로 부터, 10 여종의 미생물 중 phytase 활성이 뛰어난 SBP4 분리하였으며, 분리된 미생물을 동정한 결과, *Enterobacter*로 밝혀져 *Enterobacter* sp. 4로 명명되어졌다.

- Gram negative
- G+C 함량 : 60.95%

- Quinone type : menaquinone-8 & ubiquinone-8

- FAMES 분석

③ 분리된 균주로 부터 생산된 phytase의 효소적 특성의 분석

pH에 따른 효소활력 및 안정성을 조사한 결과, 최적 pH는 5.0, 온도에 따른 효소활력 및 안정성에서는 최적 온도는 50℃였으며 50℃ 이하에서 안정한 경향을 보여주었다. 금속이온에 따른 효소활력의 변화를 조사한 결과 EDTA, Zn⁺⁺, Ba⁺⁺, Cu⁺⁺ 그리고 Al³⁺은 효소의 활력에 커다란 감소를 초래하였다.

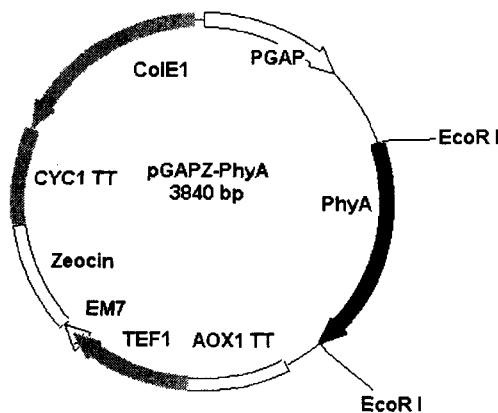
④ Phytase 유전자의 cloning 및 sequencing

2) Phytase 분비 생균제의 개발

(1) Phytase를 생산하는 *Pichia pastoris* 균주의 개발

① Phytase를 함유하는 재조합 효모용 vector의 construction

Enterobacter sp. 4로부터 유래하는 phytase 유전자의 염기서열을 바탕으로 pGAPZa A에 ligation 시킴으로 수행되었다(pGAP-phyA) (그림 1).



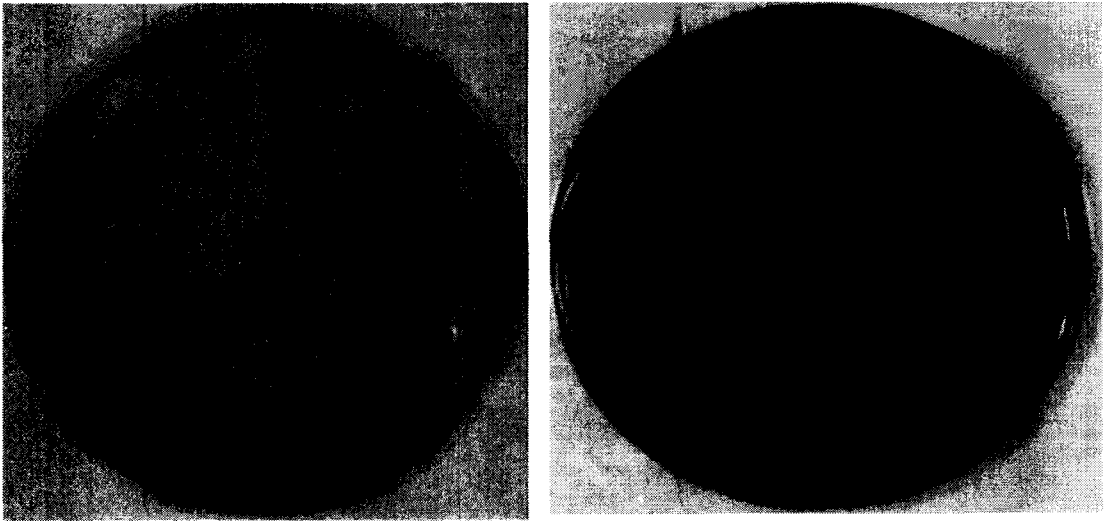
<그림 1> *Pichia pastoris*의 phytase발현 vector construction (pGAP-phyA)

② *P. pastoris*에 형질전환 및 발현 양상

구축된 재조합 vector pGAP-phyA를 electro-transformation 방법을 통해서 yeast host 균

주인 *P. pastoris*에 형질전환을 실시하였다.

형질전환된 균주에 Phytase Screening Solution을 이용하여 phytase activity를 확인하였고, 계속적인 배양에도 activity를 잃어버리지 않은 균주를 선발 하였고 이들을 pGG2, pGG26 으로 명명하였다.



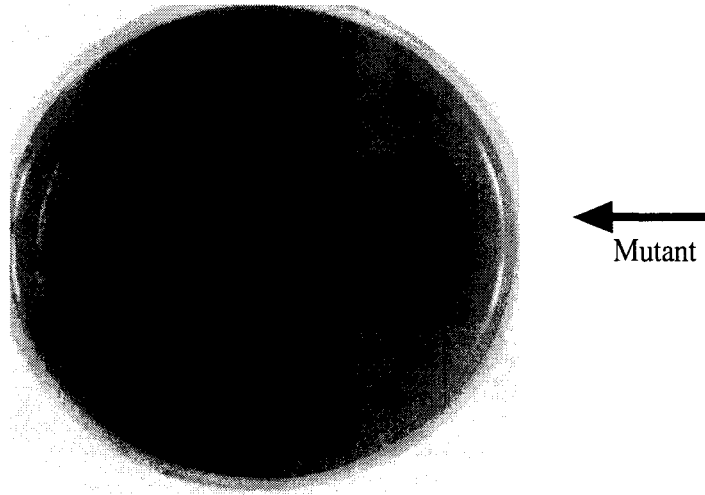
〈그림 2〉 형질전환된 *Pichia pastoris*의 PSS test 그림

③ 형질전환 *P. pastoris*의 phytase activity 측정

Phytase activity를 spectrophotometer 750nm에서 측정하였다. 측정한 결과 산업적으로 이용하기에는 다소 미비한 25.8U/L로 측정되었다.

④ UV mutagenesis에 의한 phytase activity 증가된 mutants 선발

위의 효소역가가 다소 낮은 형질전환체를 UV mutation을 실시하여 효소역가가 우수한 균주를 선발하기 위해 일정한 시간 간격으로 UV에 노출시켜 mutants를 만들고 PSS 방법으로 activity 측정하여 mutation을 통한 activity가 증가된 mutant를 선발하였다.



<그림 3> Phytase 생산 *P. pastoris*의 UV mutagenesis

(2) Phytase를 생산하는 유산균주의 개발

① Phytase를 발현하는 host 유산균주의 선발

여러 유산균 strains를 가지고 내산성, 내담즙성, 형질전환 효율 등을 조사한 결과, *Lactobacillus plantarum* 3104, *L. jonsonii*, *L. gasei*, *L. reuteri* 균주를 host 균주로 선발하였다.

② Phytase를 함유하는 유산균용 vector의 구축

유산균 발현 vector는 두 개의 vector를 구축하여 발현양상을 보았는데 vector중 하나는 유산균의 genome상에 Lac promoter에 의해서 T7 RNA polymerase가 발현할 수 있게 구축하였고 다른 vector는 T7 RNA polymerase promoter에 의해 phytase 발현될 수 있게 구축하였다.

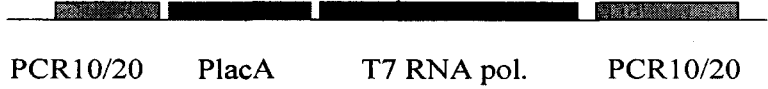
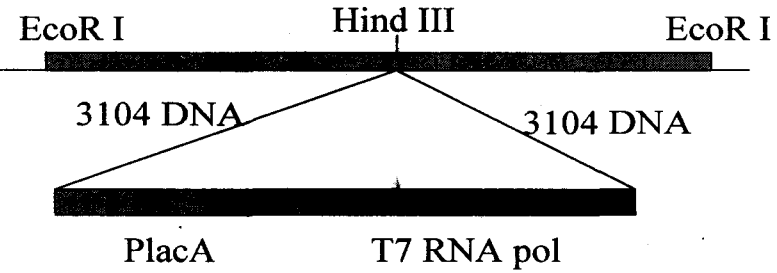
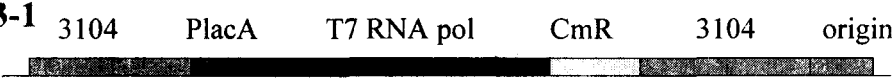
· Integration용 vector의 구축

Lac promoter와 T7 RNA polymerase가 유산균의 genomic DNA에 삽입될 수 있게 구축하였다.

· Episomal vector의 구축

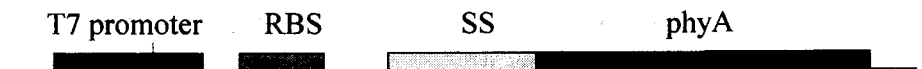
T7 RNA polymerase를 인식할 수 있는 T7 promoter에 의해 phytase가 발현할 수 있는 vector를 구축하였다.

○ Integration용 vector (총 7개)

1. pT7I-1 
2. pT7I2-1 
3. pT7I2-2 : 위의 3104 genomic 부위만 다름
4. pT7I2-3 : 위의 3104 genomic 부위만 다름
5. pT7I3-1 
6. pT7I3-2 : 위의 3104 genomic 부위만 다름
7. pT7I3-3 : 위의 3104 genomic 부위만 다름

○ Phytase발현 episomal vector

1. pPP-phyA1 (pNZ123 에 T7cassette를 이용)



2. pPP-phyA2 (pNZ3004 에 T7 cassette를 이용)

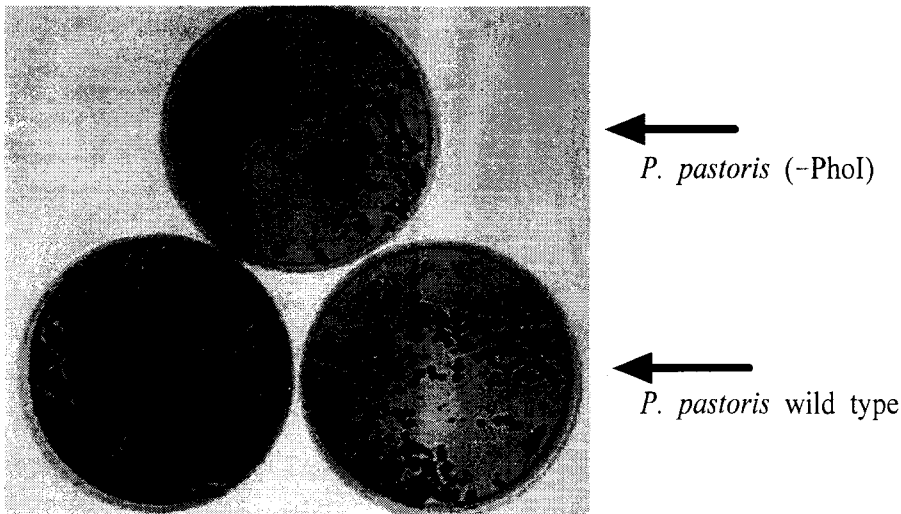
<그림 4> Phytase를 발현하기 위해 구축된 integration용 vector와 episomal용 vector

(3) 효모에서 phytase를 분비하는 새로운 유전자의 cloning

Specific activity가 우수한 phosphatase의 sequencing을 바탕으로 하여 PCR방법으로 새로운 유전자를 cloning하였다. 이는 phosphatase activity와 phytase activity 간의 상호 작용에 대한 의문으로 실행하였는데 specific activity가 우수한 phosphatase가 phytase의 activity를 갖고 있다는 생각으로 접근하였다.

① Host 균주로 사용할 *Pichia pastoris* 선발

Pichia pastoris 자체가 가지고 있는 phosphatase activity를 제거하기 위해 UV mutation을 통해서 phosphatase activity가 없는 *P. pastoris* (-PhoI) 선발하였다.



<그림 5> Phosphatase activity가 없는 *P. pastoris* 균주 (-PhoI)

② Phytase 유전자의 발현 vector로의 삽입

pGAPZ α A vector의 enzyme site에 새롭게 cloning한 phytase 유전자를 삽입하였다.

③ 형질전환체의 선별과 phytase의 특성

1) 형질전환체의 선별

각각의 형질전환체들을 50ml YPD에 배양하였다.

배양 후 중에서 가장 activity가 우수한 형질전환체의 선별하였다.

2) Phytase의 특성

Optimum pH : 5.0

Optimum temperature : 60 °C

④ 새로운 phytase (HPP)의 단백질 정제

100ml 효모 배양액 상층액으로 정제를 실시하였고 Q6 column을 이용하여 정제하였다.

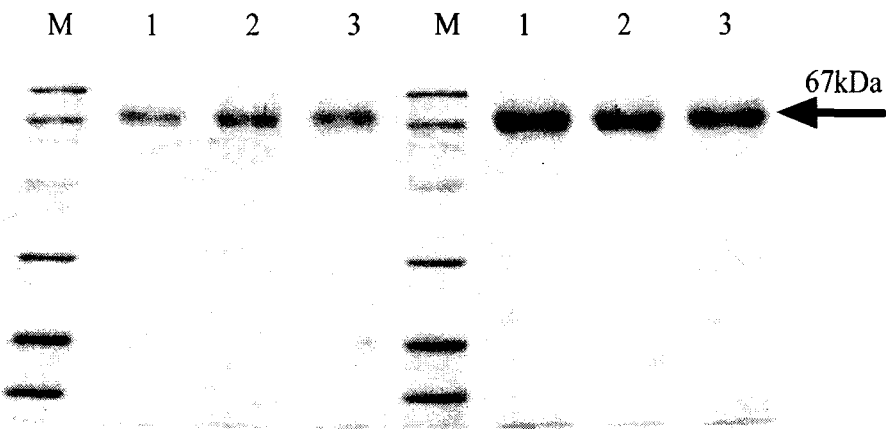
- pH 4.5 Na-acetate, 0.3M NaCl에서 elution
- pH 5.0, 60 °C 30분간 반응

	단백질 농도	효소역가	Specific activity	Fold	회수율
상층액	0.1mg/ml	7.7U/ml (680U/total)	77U/mg	1	100%
정제 후	0.74mg/ml	244U/ml (610U/Total)	329U/mg	4.2	89%

※ 1 Unit은 무기인을 1q분에 1 μmol 분리해 낼 수 있는 효소의 량으로 정의한다.

⑤ Phytase (HPP)의 분자량 측정

MW : 약 67kDa



<그림 6> 형질전환된 7-7 phy의 정제 (배양액 상층액)
Anion Q-column pH4.5 0.3M NaCl에서 elution
Lane 1, 2, 3 : HPP phytase

⑥ 산업체로의 이전

현재 phytase를 분비하는 *P. pastoris* (pHHP)는 (주) 중앙바이오텍 (사장 : 김무진)으로의 이전을 통해서 가축의 사료에 첨가하여 산업적으로 이용하고자 추진중에 있음

3) 앞으로의 실험계획

(1) Phytase 생산 효모제

- ① 현재 flask 수준에서 발현 확인된 형질전환체를 fermenter로 scale up하여 발현 양상을 조사
- ② UV mutagenesis를 통한 발현이 우수한 mutant 선별

(2) Phytase 생산 유산균제

- ① Total cellular protein의 15~20%까지 만들어 낼 수 있는 S-layer protein의 promoter와 signal sequence를 장착한 유산균용 발현 vector의 개발
→ 현재 vector는 거의 구축된 상태이며 이 vector system을 이용하여 여러가지 reporter genes의 발현을 확인함
- ② 구축된 vector system에 실험실에서 cloning한 여러가지 phytase 유전자의 도입으로 phytase를 분비하는 유산균 제제의 개발

3. 관련 논문 및 특허

1) 관련 논문

1. Min, H. K., Y. J. Choi, J. K. Ha, K. K. Cho, Y. M. Kwon, Y. H. Chang and S. S. Lee, 1994. Isolation and Identification of Anaerobic Rumen Bacterium, *Actinomyces* sp. 40 and Enzymatic Properties of β -1,4-Endo-glucanase. Asian- Australasian Journal of Animal Sciences 7(3):373-382.
2. Min, H. K., Y. J. Choi, K. K. Cho, J. K. Ha and J. H. Woo. 1994. Cloning of the

- endoglucanase gene from *Actinomyces* sp. 40 in *Escherichia coli* and some properties of the gene products. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 4(2):102-107.
3. Woo, J. H., K. K. Cho, H. K. Min and Y. J. Choi. 1995. Cloning of gene for β -glucosidase from *Ruminococcus albus* 7. *Molecules and Cells*. 5:448-451.
 4. Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 18:449-454.
 5. Cho, J. S., D. K. Chung and Y. J. Choi, 2000. Expression of *Colstridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lac. gasseri* and *Lact. johnsonii* and characterization of probiotic *Lactobacilli*, *Current Microbiology*, 40:257-263.
 6. Cho, K. K., S. C. Kim, J. H. Woo, J. D. Bok and Y. J. Choi, 2000. Cloning of a CMC-Xylanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Enzyme and Microbiol Technology*, (accepted).
 7. Lee, P. C., J. S. Cho, S. H. Kang, J. D. Bok and Y. J. Choi. 2000. Characterization of a novel fungal phytase, PhyA, from, *Penicillium oxalicum* PJ3 (*Enzyme and Microbial Technology* - submit).

2) 관련 특허

- 국내특허 : 출원번호 — 제 94-39673호, 등록일 : 1994. 12. 30
(엔테로박터 sp. 4의 파이테이즈 유전자 및 파이테이즈유전자 발현 벡터)
- 국내특허 : 출원번호 — 제 94-22649호, 등록일 : 1994. 9. 8.
(*Ruminococcus albus*의 β -glucanase 유전자 및 발현 벡터)
- 국내특허 : 출원번호 : 제96-27444호, 등록일 : 1996. 7. 8.
(셀룰로스 분해능을 갖는 트리코더마 속 미생물)

-
- 국내특허 : 출원번호 : 제97-47870호, 등록일 : 1997. 9. 20.
(*Fibrobacter succinogenes* S85의 CMC-xylanase 유전자의 염기서열 및 그 유전자의 발현)
 - 국내특허 : 출원번호 : 제98-47373호, 등록일 : 1998. 11. 12
(루미노코쿠스 알부스의 베타-글루코시다제 유전자를 함유한 발현 벡터 및 그 형질전환체)
 - 국내특허 : 출원번호 : 제2000-4429호, 등록일 : 2000. 1. 10
(*Enterobacter* sp4 유래 phytase 유전자를 함유하는 재조합 vector 및 이를 함유하는 형질전환체)