

Penicillin G Amidase생산을 위한 재조합 대장균의 유가배양에 관한 연구

이상만*

청주대학교 생명과학과

Fed-batch Culture of Recombinant *E.coli* for the Production of Penicillin G Amidase. Lee, Sang-Mahn*. Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea – Penicillin G amidase (PGA, benzylpenicillinaminohydrolase, EC 3.5.1.11) is industrially important enzyme which converts penicillin G to 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and phenylacetic acid (PAA). The PGA in *E. coli* ATCC 11105 is secreted into the periplasm after removing signal sequences and becomes heterodimer which composed of two subunits, small subunit (24 kDa) and large subunit (65 kDa). In this study, the PGA gene was obtained from *E. coli* ATCC 11105 using PCR (polymerase chain reaction) technique. The active PGA was successfully secreted into periplasm in *E. coli* BL2 1(DE3) harboring pET-*pga* plasmid. The optimized fed-batch fermentation, consisting of a three-step shift of culture temperature from 37°C to 22°C, gave a productivity of 19.6 U/mL with a cell growth of 62 O.D. at 600 nm.

Key words: Penicillin G amidase, recombinant *E.coli*, fed-batch culture

서 론

대량의 penicillin G amidase(PGA, benzylpenicillinaminohydrolase, EC 3.5.1.11)를 생산하는 재조합 균주는, 유전공학적으로 개발되어 제약 산업에서 사용하는 균주 중의 하나이다. PGA는 penicillin G를 phenylacetic acid(PAA)와 6-aminopenicillanic acid(6 APA)로 분해하고, 6 APA는 beta-lactam계 항생물질 합성을 위한 전구체로 사용된다[18]. 산업적으로 PGA를 사용하여 반 합성 penicillin을 생산하고 있고, 대부분의 산업 공정에서는 부분적으로 정제한 PGA를 immobilized form으로 만들어서 사용한다. PGA는 주로 *Escherichia coli*(*E. coli*)에서 생산되며, 재조합 *E. coli* ATCC 31052, 11105, 21285, 그리고 14945가 사용된다[8]. *E. coli* ATCC 11105의 PGA는 periplasmic enzyme이고, 24 kDa의 small subunit과 65 kDa의 large subunit으로 구성되어 있다. Precursor polypeptide (signal peptide- small subunit- spacer peptide- large subunit) 형태로 발현된 PGA가 활성을 가진 heterodimer가 되기 위해서는 signal peptide (26 아미노산)와 spacer peptide(54 아미노산)가 절단되는 다 단계의 단백질 후 처리 과정이 필요하다[4]. *E. coli* ATCC 11105의 *pga* gene이 cloning 되어 5'-과 3'-flanking region을 포함한 완전한 염기서열이 밝혀져 있으며[12], 이 유전자가 재조합 plasmid에 삽입되고 *E. coli*에 형질전환되어 과발현된 PGA의 특성이 연구되어왔다. 최근에 *Bacillus*

*megaterium*을 숙주로 사용하여 2 L의 배양기에서 PGA의 분비 발현이 보고되었고[23], 6개의 히스티딘 잔기가 달린 PGA를 *E. coli*에서 발현시켰으며 고정화한 금속이온친화성 크로마토그래피(immobilized metal-ion affinity chromatography: IMAC)방법으로 간단히 정제하는 방법이 연구된 바 있다[9]. 또한 *Alcaligenes faecalis*의 PGA 유전자를 *E. coli*에서 고농도로 발현시키려는 노력도 시도되고 있다[3, 5].

재조합 단백질의 생산성을 향상시키기 위하여 고농도 배양과 고효율 발현은 매우 중요하다[14]. 이를 실현하기 위한 노력 가운데 50 g/L 이상의 고농도의 균체에서 재조합 단백질의 고효율 발현을 실현한 보고가 있다[24]. 재조합 단백질의 고효율 발현을 위해서는 영양분의 적절한 공급이 필요하며 acetate 축적을 줄이는 노력이 필요하다[11]. 재조합 균주를 저온에서 대량으로 배양할 때에는 단백질이 불완전한 형태인 불용성 상태(inclusion body)로 발견되는 예가 많다. 그러나 저온에서 배양하면 재조합 단백질이 활성을 지닌 가용성 형태로 존재한다. 따라서 재조합 단백질을 생산하기 위하여 대량 배양과 함께 저온에서 재조합 균주를 생육시키는 것이 중요하다. 그러나 온도를 저하시키는 과정에서 미생물의 생육이 저하되거나 사멸하는 경우가 발생하기도 한다[16]. 배양과정에서 온도 변화에 따른 생리적 변화를 관찰한 많은 연구가 있었는데[19], 높은 온도에서의 영향[2, 10]뿐만 아니라 낮은 온도에서의 영향[22] 등을 조사한 바, 환경의 변화에 의하여 미생물들은 세포 내 구조적, 생리적 변화가 일어나며 항스트레스성 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 미생물이 저온 상태에서는 cold shock protein(CSPs) [1], AFGs(antifreeze proteins)와 DNA 구조와 기능에 관계되는 단백질 등을 생산하는 것으로 알려져 있다[13]. 미생물

*Corresponding author

Tel: 82-43-229-8530, Fax: 82-43-229-8525

E-mail: smlee@cju.ac.kr

이 저온 상태에서 배양하면 세포막 구조와 성분의 차이가 보이는데, 미생물의 세포막은 중온 상태로 생육 시킬 때에 비하여 저온에서 생육시키면 불포화 지방산의 함량이 증가하는 것을 볼 수 있다. 특히 저온 조건에서는 linoleic acid와 palmitoleic acid의 함량이 증가되고 이중결합의 수가 증가된다는 보고가 있다[7, 21]. 이러한 불포화 지방산의 변화에 의하여 세포막의 유동성이 증가 된다.

본 연구에서는 *E. coli* ATCC 11105에서 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭한 *pga* gene을 pET-24a(+) expression vector에 넣어 pET-*pga* plasmid를 제작하였고, 이것을 형질전환한 *E. coli* BL21(DE3)/pET-*pga* 균주에서 PGA의 과발현을 위한 배양 온도변화 전략을 모색하여 재조합 대장균의 유가배양시에 세포생육과 PGA생산을 극대화하여 얻은 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 균주는 *E. coli* ATCC 11105(KTCC), *E. coli* JM 109(Stratagene, USA), *E. coli* BL21(DE3) (Novagen Inc., USA) 이었다. pET-24a(+) 벡터는 Novagen 사(USA)로부터 구입하였고 제한효소와 *Taq* 중합효소는 TaKaRa사(Japan)의 제품을 사용하였다. SDS-PAGE의 분자량 크기 및 DNA 크기 마커는 Promega사(USA) 제품이었다.

pga 유전자 증폭 및 발현 벡터 제작

E. coli ATCC 11105로부터 게놈 DNA를 추출하여[17], *pga* 유전자의 공여체로 사용하였다. Forward primer는 *pga* gene의 translation initiation codon 부위에 상보적이고, 그 염기 서열은 GAG GAT CAT ATG AAA AAT AGA AAT(*NdeI* site 밀출)이며, reverse primer는 *pga* gene의 translation stop codon 부위에 상보적이고, 그 염기 서열은 TTT CGG CTC GAG TTA TCT CTG AAC GTG(*XhoI* site 밀출)이었다. 이 두가지 primer를 사용하여 PCR 기기(GeneAmp PCR system 2700, Applied Biosystems, CA, USA)로 94°C에서 30초간, 55°C에서 30초간, 72°C서 25초간을 1회전으로 하여 30회 반복하여 PCR을 수행하였다. PCR product를 *NdeI*, *XhoI* enzyme으로 절단하여 GeneClean Spin Kit(BIO 101)로 electroelution 하였다. pET-24a(+) vector 역시 *NdeI*, *XhoI* enzyme으로 절단하여 5.2 kbp DNA 단편을 electroelution 하였다. 이 두가지 DNA fragment를 ligation 시켜서 *E. coli* JM109에 transformation 하였다. Transformant로부터 plasmid를 miniprep 하여 *NdeI*, *XhoI* enzyme으로 절단하여 2.6 kbp의 insert와 5.2 kbp의 vector fragment를 확인하였다. 이 plasmid를 pET-*pga*라고 명명하고 다시 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환시켰다.

고농도 회분배양

E. coli BL21(DE3)/pET-*pga* 균주를 0.02 g/L kanamycin 과 2.5% lactose가 포함되어 있는 회분 배양용 배지 [KH₂PO₄ 3 g/L, Na₂HPO₄ 7 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3 g/L, yeast extract 20 g/L, glycerol 50 g/L, MgSO₄ 1 g/L, sodium citrate 1 g/L, trace metal elements]를 사용하였고 배양온도는 최초 37°C로 시작하여 600 nm에서 흡광도가 8일 때 28°C로 낮추고 흡광도가 18일 때 22°C로 변화시켰다. 진탕 배양기에서 RPM은 300에서 700까지 용존 산소 양에 따라 점차 높였으며 41시간 동안 5 L mini-jar에서 배양시켰다.

유가 배양 조건

E. coli 전배양 배지 조성은 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl, 10 g/L tryptone, 0.02 g/L kanamycin이었다. PGA 발현을 위한 본배양 배지의 조성은 glucose 10 g/L, yeast extract 5 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, Na₂HPO₄ 7 g/L, MgSO₄ 5 g/L, trace metal elements, 0.02 g/L kanamycin과 2.5% lactose이었다. 전 배양은 500 mL flask에 50 mL 전배양 배지를 넣고 본균주를 접종하여 배양하였으며 37°C, 250RPM으로 5~7시간 배양하였다. 본배양은 5 L 발효기(한국발효기, 한국에서 2 L 배양액으로 시작하여 수행하였으며 전 배양균의 접종량은 1%였고 배양액의 pH는 7.0을 유지하였다. 기질은 pH 고정에 기초한 포도당 농도 최소화 전략으로 첨가하였다. 배양액 내의 포도당 농도는 0.04%의 낮은 함양을 유지하였다. 배양온도는 최초 37°C로 시작하여 600 nm에서 흡광도가 18일 때 28°C로 낮추고 흡광도가 28일 때 22°C로 변화시켜 배양하였다.

Periplasm으로 부터 PGA의 추출

Lysozyme/EDTA 처리는 French[6] 및 Pierce 등[15]의 방법을 보완하여 실시하였다. 즉 원심 분리하여 얻은 세포를 20% sucrose와 0.5 mg/mL의 lysozyme이 들어있는 200 mM Tris, 1 mM EDTA(pH 7.5)용액에 현탁시킨 뒤 상온에서 20분 반응시켰다. 13,000 g에서 15분 원심 분리하여 periplasm 분획을 얻었다.

분석방법

사용된 균주의 생육도는 자외선-가시광선 분광광도계(Shimadzu UV-265, Japan)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다. 포도당의 농도는 당분석기(YSI model 2700 STAT, Yellow Springs Instrument Inc., Ohio, USA)로 측정하였다. PGA의 분석은 SDS-PAGE(NuPAGE 4~12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, USA)로 하였으며 coomassie brilliant blue R-200(Biorad, USA)로 염색하여 카메라로 촬영하였다. PGA 활성은 배양액을 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 7.8)로 희석하여 전체 부피가 75 µL가 되게 하고, 여기에 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 7.8)에 녹인 3.6 mg/mL 6-

nitro-3-phenylacetamidobenzoic acid(NIPAB) 25 μ L를 첨가하였다. 상온에서 반응시키며 405 nm에서의 흡광도를 측정하여 PGA 활성을 분석하였다. 또 다른 방법으로는 2 mM 인산완충액(pH 8.0)에 5% penicillin G를 첨가한 기질에 본 배양액 일정량을 첨가하여 28°C에서 경시적으로 소모된 기질의 양을 측정하였다. 활성 단위의 계산은 다음 공식과 같다.

$$\text{활성(U/mL)} = \frac{\{\text{반응 2분 후의 기질농도}(\mu\text{mol}) - \text{반응 10분후의 기질농도}(\mu\text{mol})\}}{\{\text{사용한 효소량(mL)} \times 8\text{분}\}}$$

HPLC 분석

50 mM 인산칼슘완충액(pH 6.0)에 16% ACN(ACETO-NITRILE)이 포함된 이동상으로 RP-18 역상 HPLC 컬럼(Hypersil OSD, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm)을 사용하여 1 mL/min 속도로 분리하고 225 nm 파장에서 분리한 물질을 검출하였다.

결과 및 고찰

pET-*pga* plasmid의 제작

PCR을 수행하여 signal sequence를 포함하는 2.6 kbp의 *pga* gene을 증폭하였고, 그 염기 서열은 Fig. 1과 같다. pET-*pga* plasmid를 *Nde*I, *Xho*I enzyme으로 동시에 절단하고 agarose gel에 전기영동을 하였을 때, 5.2 kbp의 pET-24a(+) vector fragment와 2.6 kbp의 *pga* gene insert fragment를 확인할 수 있었다. *pga* gene의 PCR product는 pET-*pga* plasmid의 insert fragment와 전기영동 상에서 동일한 위치에서 나타났다(Fig. 2).

pET-*pga* 함유 균주의 회분 배양

E. coli BL21(DE3)/pET-*pga* 균주를 lactose가 포함되어 있는 회분 배양용 배지에서 65시간 동안 고밀도 배양을 하고 배양액을 SDS-PAGE로 분석했을 때, PGA의 precursor, large subunit, 그리고 small subunit으로 보이는 protein band가 나타났다. 배양액을 원심분리하여 세포를 제거시키고 상등액만을 PAGE 분석하였을 때에는 protein band가 거의 나타나지 않는 것으로 보아 발현된 PGA는 세포 밖으로 분비되지 않는 것으로 판단되었다. 본 실험에 사용된 균주로부터 얻은 periplasm획분을 SDS-PAGE로 분석하였을 때 PGA의 large subunit과 small subunit의 2개의 protein band가 나타났다(Fig. 3). PGA가 가용성 전구체로 생성되고 processing을 거쳐서 large subunit과 small subunit으로 성공적으로 절단되었으며, HPLC를 이용하여 penicillin G로부터 6-APA가 생성되는 것을 확인하였다(결과제시 생략).

고농도 배양

발효는 대량배양의 조건인 30% 이상의 D.O.농도를 유지하기 위하여 적절한 교반속도, 통기조건, 온도하강 등의 조건을 최적화하였다. 최적의 조건에서 본균주의 성장과 PGA 생산은 우수하였다. T7 promotor에 의한 유전자 발현을 유도하기 위하여 IPTG 또는 lactose를 사용하는데 [2], IPTG는 가격의 문제로 효소를 산업적으로 대량 생산 할 때에는 일반적으로 사용하지 않는다. 따라서 본 실험에서는 효소의 유도제로서 lactose를 사용하였다. 공정의 편의를 위하여 배양 초기에 lactose를 넣고 효소의 발현을 유도하였다. 회분 배양의 결과는 포도당이 고갈된 20시간 이후에 효소의 발현이 시작되었으며 효소 생산이 꾸준히 증가하여 600 nm에서 흡광도가 23일 때 최종 역가가 6 U/mL이었다(Fig. 4). 이러한 회분배양의 결과를 토대로 하여 생산성을 높이기 위하여 유가배양을 실시하였다. 초기에 포도당의 농도를 충분히 유지시켜 효소의 발현을 억제하고 세포생장이 일정 수준에 도달하였을 때 포도당의 농도를 0.04% 이하로 유지하면서 서서히 효소의 발현을 유도하였다. 이 때 pH 고정(stat), glucose 최소 유지 전략을 기본으로 수행하였다. Fig. 5는 pH-stat 방법을 이용하여 유가 배양한 결과로서 시간에 따른 균체농도(O.D.₆₀₀), 포도당 농도, PGA역가를 나타내었는데 최종 결과가 균체량은 600 nm에서 흡광도가 62이며, PGA 역가는 19.6 U/mL로 나타났다. 이는 Deak 등이 [5] 보고한 4.5 U/mL보다는 약 4배의 높은 발현을 보여주었고 PGA는 세포질에서 periplasm 영역으로 성숙한 형태로 성공적으로 분비 발현되어 완전한 활성을 나타낸 것으로, 이는 나중에 PGA의 분리, 정제 시에 활용할 수 있을 것이다. 재조합 plasmid가 함유된 본 균주를 집적 배양하는 가운데 세포분해(cell lysis) 현상이 관찰되었는데 이는 온도를 저하시킬 때 공통적으로 발생하였다. 이는 향후 안정적인 유가배양을 위하여 해결해야 할 문제로 남아있다. 이러한 현상은 cold shock에 의한 세포막의 유동성에 문제가 생겨 발생하는 것으로 추측할 수 있으며 대장균의 지질A(lipid A)생합성 구조에 관한 연구를 통하여 부분적으로 설명이 가능하다. 즉 대장균을 37°C에서 생육시켰을 때 포화 지방산인 laurate가 지질A의 성분이 되며 그 결과 세포막의 견고함이 유지되는데 반하여 12°C의 저온에서 생육시켰을 때는 laurate대신에 불포화지방산인 palmotoleate가 지질A성분으로 생합성되므로 저온에서는 세포막이 불안정한 유연성을 가지게 된다 [20, 21]. 따라서 저온에서 활성화되는 palmitoyl-acyl 운반단백질을 37°C에서도 발현시킬 수 있다면 저온에서 세포분해 현상은 해결할 수 있을 것이고 유용한 단백질을 대량으로 생산할 수 있을 것이라고 생각한다.

요 약

Penicillin G amidase(PGA, benzylpenicillinamidohydro-

```

GAGGATCATA TGAAAAATAG AAATCGTATG ATCGTGAAC TGTGTACTGC TTCCTGATG 60
TATTATTGGA GCTTACCTGC ACTGGCTGAG CAGTCGTCAA GTGAGATAAA GATTGTTCGC 120
GATGAATACG GCATGCCGCA TATTATGCC AATGATACAT GGCACCTATT TTATGGCTAT 180
GGCTATGTAG TAGCACAAAG TCGCCTTTT CAGATGGAAA TGGCACGTCG CAGTACTCAA 240
GGGACTGTGC CGGAAGTGCT TGGCAAAGAT TTTGTGAAAT TTGATAAAGA TATCCGTCGT 300
AACTACTGGC CGGATGCTAT CCGGGCGCAA ATTGCTGCC TTTCCCCAGA GGATATGTCC 360
ATTCTGCAAG GCTACGCTGA TGGAAATGAAT GCCTGGACTG ATAAGGTAAA TACCAATCCA 420
GAGACGCTCT TACCAAAAACA GTTTAATACA TTTGGCTTTA CTCCTAAGCG CTGGGAACCG 480
TTTGATGTGC CGATGATATT TGTGGGCACC ATGGCAAACC GCTTCTCTGA TAGCACTAGC 540
GAAATTGATA ATCTGGCACT GCTAACGGCT TTAAAAGATA AATATGGTGT ATCACAAGGC 600
ATGGCGGTAT TTAATCAGTT GAAATGGCTG GTAAACCCAT CAGCGCCAAC CACTATTGCC 660
GTACAAGAGA GTAACTACCC ACTTAAATTT AATCAGCAA ACTCGCAAAC AGCAGCTCTG 720
TTGCCACGCT ACGATTTACC TGCACCAATG CTTGACCGAC CAGCAAAGG GGCGGATGGC 780
GCACTGTCTGG CGTTAACAGC AGGGAAGAAC CGGGAAACTA TTGCTGCACA ATTTGCACAG 840
GGTGGTGCCA ATGGTCTGGC GGGGTATCCA ACGACCCAGCA ATATGTGGGT GATCGGCAAA 900
AGCAAAGCCC AGGATGCGAA AGCAATCATG GTAAATGGTC CGCAGTTTGG CTGGTATGCG 960
CCTGCGTATA CTTATGGTAT TGGTCTGCAC GGTGCTGGTT ATGATGTCAC TGGCAATACA 1020
CCATTTGCCT ATCCTGGGCT GGTTTTTGGT CATAATGGTG TGATTTCTTG GGGATCAACG 1080
GCAGTTTTCG GCGATGATGT CGATATTTT GCTGAACGGC TGTCGGCAGA GAAACCAGGC 1140
TACTACTTGC ATAATGGTAA GTGGTGAAA ATGTTAAGCC GTGAGGAAAC CATTACGGTG 1200
AAAAATGGTC AGGCAGAGAC CTTTACTGTC TGGCGTACGG TGCATGGCAA CATTCTCCAA 1260
ACTGACCAGA CGACACAAAC GGCTTACGCT AAATCCCGCG CATGGGATGG TAAAGAGGTG 1320
GCGTCTTTGC TGGCCTGGAC TCATCAGATG AAGGCCAAAA ATTGGCAGGA GTGGACACAG 1380
CAGGCAGCGA AACAAGCACT GACCATCAAC TGGTACTATG CTGATGTAAA CGGCAATATT 1440
GGTTATGTTC ATACTGGTGC TTATCCAGAT CGTCAATCAG GCCATGATCC GCGATTACCC 1500
GTTCTCGGTA CGGGAAAATG GACTTGGAAA GGGCTATTGC CTTTTGAAAT GAACCCTAAG 1560
GTGTATAACC CCCAGTCGGG ATATATTGCT AACTGGAACA ATTCTCCCA AAAAGATTAT 1620
CCCGCTTCAG ATCTGTTTGC CTTTTTTGTGG GGTGGTGCAG ATCGCGTTAC GGAGATCGAC 1680
CGACTGCTTG AGCAAAAGCC ACGCTTAACT GCTGATCAGG CATGGGATGT TATTCGCCAA 1740
ACCAGTCGTC AGGATCTTAA CCTGAGGCTT TTTTACCTA CTCTGCAAGC AGCGACATCT 1800
GGTTTGACAC AGAGCGATCC GCGTCTCAG TTGGTAGAAA CATTAAACAG TTGGGATGGC 1860
ATCAATTTGC TTAATGATGA TGGTAAAACC TGGCAGCAGC CACCGTCTGC CATCCTGAAC 1920
GTTTGGCTGA CCAGTATGTT GAAGCGTACC GTAGTGGCTG CCGTACCTAT GCCATTTGAT 1980
AAGTGGTACA GCGCCAGTGG CTACGAAACA ACCCAGGACG GCCCAACTGG TCGCTGAAT 2040
ATAAGTGTG GAGCAAAAAT TTTGTATGAG GCGGTGCAGG GAGACAAATC ACCAATCCCA 2100
CAGGCGGTTG ATCTGTTTGC TGGGAAACCA CAGCAGGAGG TTGTGTTGGC TCGCTGGAA 2160
GATACCTGGG AGACTCTTTC CAAACGCTAT GGCAATAATG TGAGTAACTG GAAAACACCT 2220
GCAATGGCCT TAACGTTCCG GGCAAATAAT TTCTTTGGTG TACCGCAGGC CGCAGCGGAA 2280
GAAACGCGTC ATCAGGCGGA GTATCAAAC CGTGGACAG AAAACGATAT GATTGTTTTC 2340
TCACCAACGA CAAGCGATCG TCCTGTGCTT GCCTGGGATG TGGTCGCACC CGGTCAGAGT 2400
GGGTTTATTG CTCCCGATGG AACAGTTGAT AAGCACTATG AAGATCAGCT GAAAATGTAC 2460
GAAAATTTG GCCGTAAGTC GCTCTGGTTA ACGAAGCAGG ATGTGGAGGC GCATAAGGAG 2520
TCGCAGGAAG TGTTGCACGT TCAGAGATAA CTCGAGCCGA AA 2562

```

Fig. 1. Nucleotide sequences of PCR product for *pga* gene from *E. coli* ATCC 11105. Underline indicate the restriction site (*Nde*, *Xho*) and bold letters are the first codon of small subunit, spacer, and large subunit. The italic letters indicate the translation initiation codon, stop codon of *pga* gene.

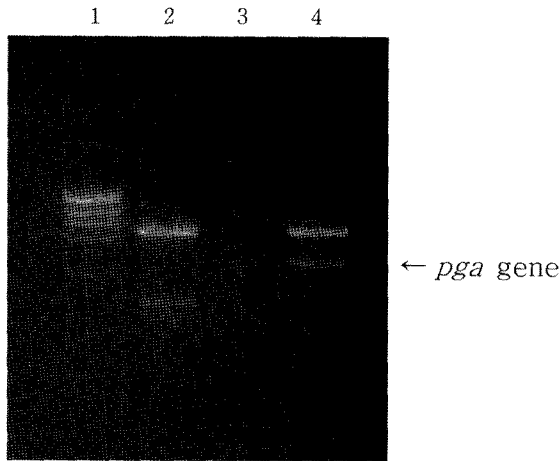


Fig. 2. Gel electrophoresis patterns of pET-*pga* plasmid. Lane 1, λ Hind III marker (23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.5 kbps); Lane 2, pET-*gcp* plasmid/*Nde*I, *Xho*I cut (5.2, 1.1, 0.9 kbps); Lane 3, PCR product of *pga* gene (2.6 kbps); Lane 4, pET-*pga* plasmid/*Nde*I, *Xho*I cut (5.2, 2.6 kbps).

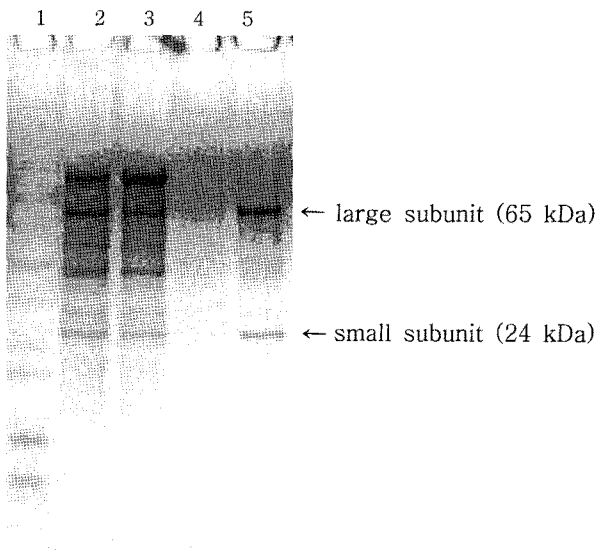


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the protein extract of recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET-*pga*. Lane 1, SeeBlue marker; Lane 2, The protein extract of culture at 48 hrs (O.D.₆₀₀=40); Lane 3, The protein extract of culture at 65 hrs (O.D.₆₀₀=62); Lane 4, The supernatant of culture broth after centrifugation.; Lane 5, Periplasmic fraction after lysozyme/EDTA treatment.

lase, EC 3.5.1.11)는 penicillin G를 phenylacetic acid(PAA)와 6-aminopenicillanic acid(6-APA)로 분해하는 효소이다. *Escherichia coli*(*E. coli*) ATCC 11105의 PGA는 24 kDa의 small subunit과 65 kDa의 large subunit으로 구성되어 있고, precursor polypeptide에서 signal peptide와 spacer peptide가 절단되어 활성을 가진 heterodimer가 형성된다. 본 연구에서는 *E. coli* ATCC 11105에서 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭한 *pga* gene을 expression vector에 넣

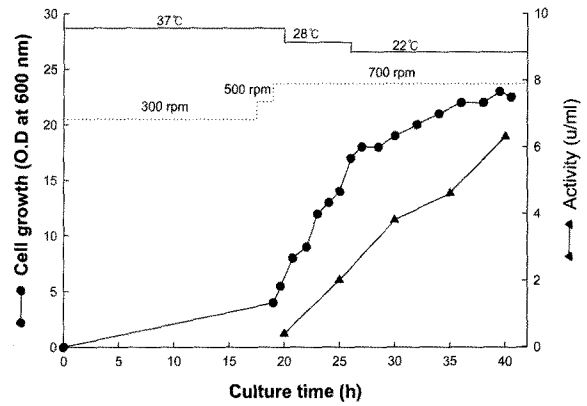


Fig. 4. Pattern of cell growth and PGA production in batch fermentation of *E. coli* BL21(DE3)/pET-*pga* with the three-step temperature shift from 37°C to 22°C.

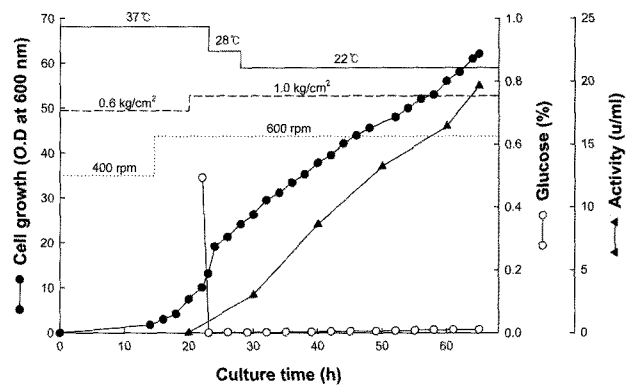


Fig. 5. Cell growth and PGA production profiles in fed-batch fermentation of *E. coli* BL21(DE3)/pET-*pga* with the three-step temperature shift from 37°C to 22°C on pH-stat control.

어 pET-*pga* plasmid를 제작하였고, 이것을 *E. coli* BL21 (DE3) 균주에 형질 전환하여 PGA를 발현하고 그 활성을 분석하였다. *E. coli* BL21(DE3)/pET-*pga* 균주의 고밀도 배양액을 SDS-PAGE로 분석했을 때, PGA의 precursor, large subunit, 그리고 small subunit으로 보이는 protein band가 나타났으며, PGA가 soluble form의 precursor로 발현되어 processing을 거쳐서 large subunit과 small subunit으로 절단되기도 하고, 일부는 insoluble form의 precursor로 발현되기도 하는 것으로 생각된다. 유가배양시 온도변화 전략을 사용하여 고농도 배양에서 발현을 유도하였다. 온도변화 전략은 37°C에서 28°C를 거쳐 22°C로 3단계로 변화시켰다. 이러한 전략으로 PGA활성은 19.6 U/mL이며 균체량은 600 nm에서 흡광도가 62까지 도달하였다.

REFERENCES

1. Buttrick, P. 2006. The regulation of heat shock protein expression: how, when and where. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**:

- 785-786.
2. Carty, S. M., K. R. Sreekumart, and C. R. H. Raetz. 1999. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**: 9677-9685.
 3. Cheng, S. W., Q. X. Song, D. Z. Wei, and B. X. Gao. 2007. High-level production penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* in recombinant *Escherichia coli* with optimization of carbon sources. *Enzyme. Microb. Technol.* **41**: 326-330.
 4. Choi, K. S., J. A. Kim, and H. S. Kang. 1992. Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *J. Bacteriol.* **174**: 6270-6276.
 5. Deak, P. M., S. Lutz-Wahl, H. Bothe, and L. Fisher. 2003. Bioreactor cultivation of *Escherichia coli* for production of recombinant penicillin G amidase from *Alcaligenes faecalis*. *Biotech. Lett.* **25**: 397-400.
 6. French, C., E. K. Moore, and J. M. Ward. 1996. Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm. *Enzyme Microb. Technol.* **19**: 332-338.
 7. Fukushima, H., C. E. Martin, H. Iida, Y. Kitajima, and G. A. Nozawa. 1976. Changes in membrane lipid composition during temperature adaptation by a thermotolerant strain of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **43**: 165-179.
 8. Kheirrolomoom, A., M. Ardjmand, H. Fazelinia, and A. Zakeri. 2001. Clarification of penicillin G acylase reaction mechanism. *Process Biochem.* **36**: 1095-1101.
 9. Kim, J. H., H. J. Kang, E. S. Kim, J. H. Kim, and Y. M. Kim. 2004. One-step purification of poly-his tagged penicillin G acylase expressed in *E.coli*. *J. Microbial. Biotechnol.* **14**: 231-236.
 10. Lamotte, D., M. Ouzzine, S. Fournel-Gigleux, J. Magdalou, and J. Boudrant. 1996. A temperature profile in batch culture to increase the production of the recombinant UDP-glucuronosyltransferase 2B4 in *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **31**: 235-241.
 11. Lan, J. C., T. C. Ling, G. Hamilton, and A. Lyddiatt. 2006. A fermentation strategy for anti-MUC1 C595 diabody expression in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **11**: 425-431.
 12. Oh, S. J., Y. C. Kim, Y. W. Park, S. Y. Min, I. S. Kim, and H. S. Kang. 1987. Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* **56**: 87-97.
 13. Panoff, J. M., B. Thammavongs, M. Gueuen, and P. Boutibonnes. 1998. Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**: 75-83.
 14. Park, Y. C., S. J. Kim, J. H. Choi, W. H. Lee, K. M. Park, M. Kawamukai, Y. W. Ryu, and J. H. Seo. 2005. Batch and fed-batch production of coenzyme Q(10) in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 192-196.
 15. Pierce, J. J., C. Turner, E. K. Moore, and P. Dunnill. 1997. Factors determining more efficient large-scale release of a periplasmic enzyme from *E. coli* using lysozyme. *J. Biotech.* **58**: 1-11.
 16. Rinas, U., H. A. Krackehelm, and K. Schugerl. 1989. Glucose as a substrate in recombinant strain fermentation technology by-product formation, degradation and intracellular accumulation of recombinant protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 163-167.
 17. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
 18. Sobotková, L., V. Štěpánek, K. Plháčková, and P. Kyslík. 1996. Development of a high-expression system for penicillin G acylase based on the recombinant *Escherichia coli* strain RE3(pKA18). *Enzyme and Microbial Technology.* **19**: 389-397.
 19. Strandberg, L., and S. O. Enfors. 1991. Batch and fed batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **13**: 609-614.
 20. Vaara, M. and M. Nuaminen. 1999. Outer membrane permeability barrier in *Escherichia coli* mutant that are defective in the late acyltransferase of lipid A biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1459-1462.
 21. Vorachek-Warren, M. K., S. M. Carty, S. Lin, R. J. Cotter, and C. R. H. Raetz. 2002. An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shock-induced palmitoleoyltransferase of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 14186-14193.
 22. Wouters, J. A., H. H. Kamphuis, J. Hugenholtz, O. P. Kuipers, W. M. De-Vos, and T. Abec. 2000. Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3686-3691.
 23. Yang, Y., R. Biedendieck, W. Wang, M. Gamer, M. Malten, D. Jahn, and W. D. Deckwer. 2006. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories* **5**: 36-50.
 24. Yim, S. C., K. J. Jeong, H. N. Chang, and S. Y. Lee. 2001. High-level secretory production of granulocyte-colony stimulating factor by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **24**: 249-254.

(Received Nov. 2, 2008/Accepted Dec. 3, 2008)