

*Bacillus cereus*에 의한 phospholipase C (PLC) 생산

서국화, 이종일, Uwe T. Bornscheuer*

전남대학교, 물질·생물화학공학과, 화학공학부

University of Greifswald, Department of Biochemistry*

전화 (062)530-0847, FAX (062)530-1847

Abstract

Bacillus cereus secretes a nonspecific phospholipase C (PLC) that catalyzes the hydrolysis of phospholipids to yield diacylglycerol and a phosphate monoester. This study focuses on the production of PLC by *B. cereus* and recombinant *E. coli* with fusion protein gene (plc::gfp). Fermentation processes have been monitored by a 2-dimensional fluorescence sensor.

서론

Phospholipase C (PLC)는 천연 phospholipid를 diacylglycerol과 유기 phosphate로 분해하는 효소로써 *Clostridium*, *Bacillus* 등으로부터 생산할 수 있다. 본 연구에서는 *B. cereus*를 이용하여 PLC를 생산하고 배양액 중의 PLC를 모니터링하는 기술을 개발하고자 한다. 또한, *B. cereus* ATCC10987에서 분리된 PLC 유전자와 mutant *Aequorea victoria*에서 분리된 green fluorescent protein (GFP) 유전자를 융합하여 *Escherichia coli*에 도입하고, 유전자 재조합 *E. coli* 내의 plc::gfp fusion protein의 발현정도를 2차원 형광센서로 모니터링하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 실험에서 사용된 숙주는 *B. cereus* 318 (from Prof. Uwe T. Bornscheuer, Uni. Greifswald, Germany)과 *E. coli* BL21(DE3) pLysS이고, 재조합 단백질 발현을 위한 vector로는 pET-23a (Novagen, Amp.^R)를 사용하였다. *B. cereus* 균주 배양을 위해서는 Luria Broth (LB) 배지를 사용하였고, *E. coli* 균주의 배양을 위해서는 50 mg/L의 ampicillin이 포함된 MS8 배지(6 g/L Glucose, 1 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.2 g/L NH₄HCl, 2 g/L(NH₄)₂SO₄, 13 g/L KH₂PO₄, 10 g/L K₂HPO₄, 6 g/L NaH₂PO₄ ·

2H₂O, 4 ml/L trace element solution, 4 ml/L vitamin solution)를 사용하였다. 한편, *B. cereus* ATCC10987에서 분리된 PLC 유전자 (from Prof. Mary F. roberts, Boston college)와 mutant *Aequorea victoria*에서 분리된 green fluorescent protein (GFP) 유전자를 pET-23a에 삽입하여 재조합 plasmid pFS1을 제조하여 사용하였다.

2. 배양방법

종균배양은 우선 냉동 보관된 종균을 5 ml LB 배지에서 12시간 배양하여 활성화시킨 후, 각 배지에 1 %의 종균 배양액을 접종하였다. Extracellular PLC를 생산하는 *B. cereus* 318는 LB 배지를 사용하여 37 °C에서 2.5 L 생물 반응기 (1 vvm, 400 rpm, pH 7)를 이용하여 배양하였고, intracellular PLC를 생산하는 재조합 *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pFS1]는 최소배양액 MS8 배지를 사용하여 진탕 배양기 (250 ml 진탕용기, 37°C, 180 rpm)에서 배양하였다. 그리고 MS8 배지를 이용한 *E. coli* 배양의 경우에는 일정 시간 후 0.4 mM IPTG를 첨가하여 *plc::gfp* fusion protein의 발현을 유도하였다.

3. 분석방법

생산된 extracellular PLC와 intracellular PLC의 농도는 기질로써 p-Nitrophenylphosphorylcholine (p-NPPC)을 이용하여 spectrophotometric assay법으로 측정하였다. 즉, p-NPPC는 PLC에 의해 p-nitrophenol과 phosphorylcholin으로 분해되는데 생성된 p-nitrophenol은 유색반응을 일으키므로 이를 분광광도계를 이용하여 410 nm에서 측정하여 PLC 농도를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. *B. cereus* 318로 부터의 PLC 생산

생물 반응기를 이용하여 *B. cereus* 318로 부터 PLC를 생산하는 공정을 모니터링하고, 매 시간마다 시료를 채취하여 균주의 성장속도를 살펴보았다. 또한 채취한 시료를 원심분리하여 얻어진 상등액 속에 존재하는 PLC를 정량하여 균주의 성장속도와 의 관계성도 살펴보았다.

2. *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pFS1]로 부터의 PLC 생산

진탕 배양기를 이용하여 *plc::gfp* fusion protein을 생산하는 재조합 *E. coli* BL21(DE3)

pLysS [pFS1]를 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 OD₆₀₀, pH, PLC를 측정하였다. 그리고 형광분광광도계 (Fluorescence spectrophotometer, Hitachi, F-4500)를 이용하여 재조합 *E. coli*의 형광 특성을 측정하고 생산된 PLC와의 상관관계를 살펴보았다. 또한, 2.5 L 생물 반응기에서 재조합 *E. coli*를 배양하고 형광센서로 모니터링하여 PLC 생산 특성을 고찰하였다.

요약

공업적으로 중요성이 날로 더해가는 phospholipase C (PLC)를 *Bacillus cereus*를 이용하여 생산하였다. 또한, plc::gfp fusion protein을 생산하는 재조합 *E. coli*를 제조하고 배양하였으며 특히 형광센서를 이용하여 PLC의 생산 특성을 모니터링하였다.

감사

본 연구는 2001년도 한국과학재단 국제공동연구과제(20015-307-01-2) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Susumu Kurioka and Makoto Matsuda, "Phospholipase C Assay Using p-Nitrophenylphosphorylcholine Together with Sorbitol and Its Application to Studying the Metal and Detergent Requirement of the Enzyme"(1976), *Analytical Biochemistry*, **75** : 281-289.
2. Cristina A. Tan, Michael J. Hehir, and Mary F. Roberts, "Cloning, Over expression, Refolding, and Purification of the Nonspecific Phospholipase C from *Bacillus cereus*" (1997), *Protein Expression and Purification*, **10** : 365-372.
3. Jong Il Rhee, Sang-yun Chung, and Kook-hwa Seo, "Monitoring of Biological Processes by 2-dimensional Fluorescence Sensor"(2001), *Korean J. Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **16** : 493-499