

박테리오파아지의 세포용해작용을 이용한 재조합 대장균으로부터의 Poly(3-hydroxybutyrate) 회수

정 옥 희 · 한 세 광 · †장 용 근 · 이 상 업
한국과학기술원 화학공학과, 생물공정연구센터

Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate) from Recombinant *Escherichia coli* by Autolysis with Bacteriophage Lambda

Ok-Hee Jeung, Sei-Kwang Hahn, Yong-Keun Chang[†] and Sang-Yup Lee

Dept. of Chem. Eng. and BioProcess Eng. Research Center,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Teajon 305-701, Korea

ABSTRACT

An autolytic system based on a thermally inducible phage lambda, λ HLL1, has been applied for the recovery of poly(3-hydroxybutyrate) [PHB] from a recombinant *Escherichia coli*, XL1-Blue, harbouring a plasmid (pSYL105) containing the *Alcaligenes eutrophus* PHB biosynthesis genes. The lytic capability of λ HLL1 was evaluated in flask culture for both lysogens, XL1-Blue (λ HLL1) and XL1-Blue (λ HLL1, pSYL105). When the optical density of culutre at 600nm(OD₆₀₀) reached 0.2, cell lysis was induced by increasing the temperature from 30°C to 42°C. Most cells of XL1-Blue (λ HLL1) were lysed by the autolytic system in an hour after the thermal induction, while the lytic efficiency was slightly lower for XL1-Blue (λ HLL1, pSYL105). The existence of pSYL105 in cells seemed to inhibit, to some extent, the lytic capability of λ HLL1 even at low PHB content. The lytic efficiency remarkably decreased as the induction was delayed to allow PHB accumulation. When a chemical induction using 2% (v/v) chloroform was introduced after an hour of thermal induction, we could obtain a good lytic efficiency.

서 론

일반적으로 미생물을 이용한 유용물질의 생산에 있어서 분리정제에 드는 비용이 전체 생산비의 60~70%를 차지하므로(1), 효과적인 분리정제 공정의 개발이 생물공학 기술의 산업화를 가능하게 한다고 할 수 있다. 미생물 세포내의 축적산물(intracellular product)을 회수할 때에는 세포를 파괴하는 과정이 필수적이다. 이를 위해 homogenizer, ball mill

등을 이용하는 기계적 방법과(1, 2), sodium hypochlorite나 sodium dodecyl sulfate 등을 이용하는 화학적 방법(3-5), 그리고 효소를 사용하는 방법 등이 제안되어졌다(1, 6). 한편, 분해능이 있는 용균효소(lytic enzyme)의 유전자를 클로닝하여 세포파괴 공정에 응용하려는 시도가 실험적으로 진행되어 왔다(7). 이러한 효소에는 자가용균효소(autolytic enzyme), colicin 용균효소 그리고 bacteriophage 용균효소 등이 있다(7). Autolytic enzyme은 세포 분열시 세포벽을 깨뜨리는 효소인 autolysin으로서 muramidase, glucosamidase, endopeptidase, trans-

† Corresponding Author

glycosylase, amidase 등이 있다.

박테리오파아지에 대해서는 박테리오파아지 λ 와 T4 그리고 ϕ X174의 용균효소를 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔으며(8-12), λ 파아지의 세포파괴 현상에 대한 연구를 위하여 주로 대장균이 숙주세포로 사용되어져 왔다(10). 이때, 박테리오파아지에 의한 세포파괴는 분해효소 lysozyme에 의한 것으로 밝혀졌다. 한편, 잠복상태로부터 λ 파아지의 발현이 유도될 때, 단순한 온도 증가에 의해서 발현이 유도되는 온도 감수성 돌연변이주(temperature-sensitive mutant)가 만들어졌다(7). 이 돌연변이주는 파아지 λ 가 잠복상태로 유지되게 하는 λ repressor 유전자 *cl* 산물을 온도가 높아지면 그 기능이 상실되도록 돌연변이 시킴(*cl*₈₅₇)으로써 얻어졌다. 이러한 연구결과는 lytic protein을 design하여 세포파괴에 응용할 수 있다는 가능성을 보여주었다. 최근에는, *E. coli* double-lysogen[P90c/(λ H1, ϕ 434)]를 사용하여 원하는 단백질이 생산된 후 연이어 세포파괴가 일어나도록 하는 방법이 제안되어지기도 하였다(13).

미생물에 의한 poly(3-hydroxyalkanoate), PHA의 합성은 unbalanced growth 상태에서 일어나는데 탄소원은 풍부하나 질소원, 산소, 황, 인 등이 부족하게 되면 acetyl coenzyme A로부터 3단계의 반응경로를 거쳐 PHA가 생합성된다(14-16). 최근에는 재조합 대장균을 이용한 PHA 생산에 대해 많은 연구가 진행되고 있는데, 높은 PHB 축적율과 고농도 세포배양 기술의 확립(17-21) 그리고 분리정제가 용이하다는 장점 등이 있는 것으로 알려졌다(22).

PHA는 기존의 합성고분자와 물리, 화학, 기계적 성질이 비슷할 뿐 아니라 생분해성, 생체적합성, 압전성, 서방성 등의 우수한 성능과 구조의 다양성이라는 장점을 지니고 있어서, 각종 포장재와 용기소재를 비롯하여 의료용 봉합사, 접골이음쇄, 스텐트의 의료용구, 농약 및 식물종자 등의 코팅용 소재 등으로 폭넓게 활용될 수 있다(23, 24). 그러나, 생산단가가 비싸기 때문에 그 사용범위가 특수목적에만 제한되고 있는 실정이다. 생산단가를 낮추기 위한 접근방법으로는 우수 균주의 개발·개량, 생물반응기 시스템의 최적화, 효율적인 분리정제 기술의 개발 등이 있는데 실제로 분리정제에 드는 비용이 많기 때문에 이에 대한 연구가 중요하다.

본 연구에서는 박테리오파아지의 세포용해작용을 이용하여 재조합 대장균에 의해 생합성된 PHB를 효

과적으로 회수하는 방법을 개발하고자 하였다. *cl*₈₅₇ 유전자를 지닌 박테리오파아지 λ 를 대장균에 감염시킨 후 잠복상태(lysogenic state)의 균만을 선발한 다음, 이 균에 PHA 생합성 플라스미드를 도입하여 원하는 재조합 균주를 만들었다. 만들어진 균주의 열적유도에 의한 세포파괴 효율을 측정하였고, PHB의 축적과 박테리오파아지 λ 에 의한 세포파괴 효과의 상관관계에 대해 알아 보았다. 그리고 세포파괴를 보다 용이하게 하기 위하여 화학적 용균에 대해서도 알아 보았으며, 결론적으로 이러한 방법을 이용하여 재조합 대장균에 의해 생합성된 PHB를 효과적으로 분리정제할 수 있는가를 검토하였다.

재료 및 방법

균주

대장균 숙주세포는 XL1-Blue(Table 1)를 사용하였고 박테리오파아지 λ H1을 함유한 lysogen은 Lee and Chang의 방법(25)으로 얻었다. 여기에, PHA 생합성 플라스미드 pSYL105를 electroporation으로 도입하여 XL1-Blue(λ H1, pSYL105)를 만들었다. 유전자 조작에 관한 사항에 대해서는 Sambrook *et al.*의 방법에 따라 행하였다(26). 박테리오파아지 λ H1은 캘리포니아 주립대학(Irvine)의 Henry C. Lim 교수로부터 분양받았으며 플라스미드 pSYL105는 *Alcaligenes eutrophus*의 PHA biosynthesis gene과 *parB* locus를 클로닝하여 만들었다(21). 사용된 균주와 플라스미드를 Table 1에 정리하였다.

배지 및 세포배양

XL1-Blue와 XL1-Blue(λ H1)는 배지 선택을 위한 예비실험 결과에 따라 Tryptone 10g/l, yeast extract 5g/l, NaCl 10g/l로 구성되어 있는 LB medium에 포도당을 0.1%(w/v) 첨가하여 만든 배지를 사용하였다. XL1-Blue(pSYL105)와 XL1-Blue(λ H1, pSYL105)에 대해서는 PHB의 효과적인 생합성 및 축적을 위하여 LB에 포도당이 2%(w/v) 첨가된 배지를 사용하였다. 균은 250ml 플라스크를 사용하여 30°C, 200rpm에서 진탕배양하였고, 플라스미드 pSYL105를 가지고 있는 균주를 선별하기 위해서 100 μ g/ml의 암피실린을 첨가하였다.

세포파괴 유도

30°C에서 적정농도까지 균주를 배양한 후 42°C로

Table 1. *E. coli* strain, bacteriophage lambda, and plasmid used in this study.

Microorganisms	Relevant characteristics	Source/reference
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F</i> [<i>proAB⁺ lac^s lacZΔ M15 Tn1(Δtet)</i>]	Stratagene ¹
λHL1	<i>LacZ, Qam73², cl₈₅₇</i>	UC, Irvine ³
pSYL105	8.8kb, Ap ^r , PHA operon ⁴ stb ⁵	Lab stock, 21

- 1) Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA92037, U. S. A.
- 2) This amber mutation can be suppressed by supE.
- 3) University of California at Irvine, CA92717, U. S. A.
- 4) 5.2kb PHA biosynthesis operon from *Alcaligenes eutrophus* H16.
- 5) *parE*(*boe/sob*) locus of plasmid R1.

온도를 올려서 1시간, 2시간, 3시간 동안 열적유도 (thermal induction)를 하여 세포파괴를 일으켰다. 세포파괴를 보다 용이하게 하기 위하여 화학적 용균을 병행해서 실험해 보았다(7). 먼저 1시간 동안 열적 유도를 한 후 2% (v/v)의 chloroform이나 40μg/ml의 chloramphenicol을 첨가한 다음 mixing을 하면서 세포파괴를 관찰하였다.

분석방법

세포성장과 세포파괴 정도는 spectrophotometer (Beckman Co. Model)를 이용하여 600nm에서의 탁도(OD₆₀₀)를 측정하여 분석하였다. 건조 균체 중량(dry cell weight, DCW)은 배양액과 함께 채취된 세포를 5000rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 증류수로 씻은 다음, 80℃의 drying oven에서 충분히 말린 후 무게를 측정하여 얻었다. PHB 농도측정은 Braunegg *et al.*이 제안한 방법(27)에 따라 gas chromatography(GC)를 사용하여 행하였다. *n*-butyric acid를 internal standard로 사용하였고 chloroform으로 용매추출하여 얻은 PHB를 순도 100%라 가정하여 PHB standard로 사용하였다(22).

결과 및 고찰

XL1-Blue(pSYL105)와 XL1-Blue(λHL1, pSYL105)의 PHB 생합성

XL1-Blue(pSYL105)와 XL1-Blue(λHL1, pSYL105)의 PHB 축적정도를 비교해 보기 위하여 배양 시간에 따른 세포농도와 PHB 농도의 변화를 측정하였다(Fig. 1 and 2). XL1-Blue(pSYL105)의 경우 48시간 동안 배양했을 때, 세포건조 중량농도가

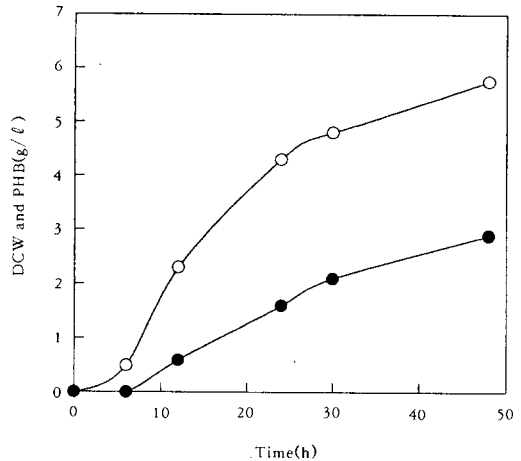


Fig. 1. Cell growth and PHB accumulation of XL1-Blue(pSYL105): (○) dry cell weight, (●) PHB.

5.8g/l에 이르렀고 PHB 농도는 2.9g/l 정도가 되었다(Fig. 1). XL1-Blue(λHL1, pSYL105)를 48시간 배양했을 때는, 세포건조 중량농도가 4.8g/l에 이르렀고, PHB 농도는 2.6g/l 정도가 되었다(Fig. 2). 배양한 XL1-Blue(λHL1, pSYL105)와 XL1-Blue(pSYL105)를 현미경(×1,000)으로 관찰하였는데, 두 균주에서 모두 PHB가 축적되어 있는 것을 확인할 수 있었지만 균의 크기에 있어서는 XL1-Blue(λHL1, pSYL105)가 XL1-Blue(pSYL105)보다 약 2배 정도 큰 것으로 나타났다. 일반적으로 박테리오파지에 의해 감염된 대장균은 정상 상태의 균에 비해 세포분열이 어려운 것으로 알려져

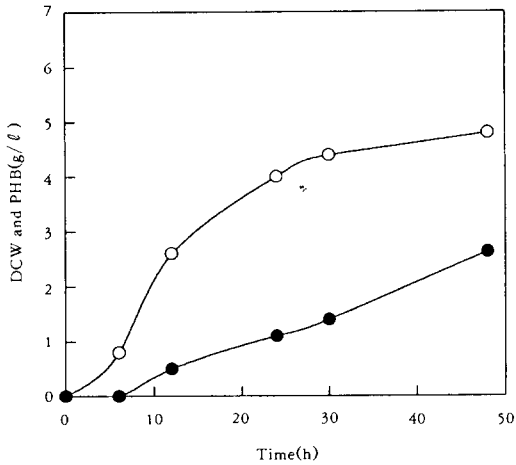


Fig. 2. Cell growth and PHB accumulation of XL1-Blue(λ HL1, pSYL105): (○) dry cell weight, (●) PHB.

있는데 이것은 본 실험에서의 관찰결과와 일치하였다. 뿐만 아니라, XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)의 경우 파아지 λ 에 의해 세포성장과 PHB의 생합성이 약간 저해되는 것으로 나타났다.

대수기에서 열적유도에 의한 세포파괴

XL1-Blue(λ HL1)의 열적유도에 의한 세포파괴 효과가 Fig. 3에 나타나 있다. 이론적으로는 단순히 온도를 증가시킴으로써 파아지 λ 의 cI_{857} 유전자가 발현되어 lysogen 상태에서 lytic 경로로 전환되어 세포파괴가 일어나야 한다. XL1-Blue와 XL1-Blue(λ HL1)을 OD_{600} 가 0.2 정도 되도록 키운 다음, 열적유도를 한 것과 안한 것을 비교분석하기 위하여 세포파괴 정도를 OD_{600} 값으로 알아 보았다. 열적유도 후 30분 동안은 XL1-Blue와 XL1-Blue(λ HL1)이 모두 열적유도를 하지 않는 것보다 조금 더 자랐다. 그러나, 열적유도를 1시간 동안 하였을 경우 XL1-Blue(λ HL1)의 OD_{600} 값이 0.38에서 0.05로 떨어졌는데, 이는 파아지 λ 에 의한 세포파괴 현상 때문인 것 같았다. 이에 반해 XL1-Blue는 열적유도와 관계없이 오히려 OD_{600} 값이 증가하였는데, 이것은 대장균의 최적 배양온도가 37°C이기 때문에 30°C에서 보다 42°C에서 대수기의 세포생장이 보다 용이했던 것으로 생각되어 진다. 한편, XL1-Blue(λ HL1)의 경우 시간이 지나도 OD_{600} 값이 0.05 정도에 머무는 것은 세포가 완전히 파괴되지 않은 것이

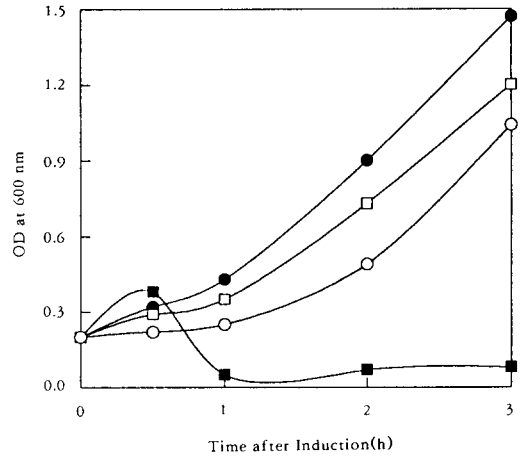


Fig. 3. Effect of a thermal induction on the cell lysis of XL1-Blue(λ HL1) when $OD_{600}=0.2$: (□) XL1-Blue(λ HL1) without thermal induction, (■) XL1-Blue(λ HL1) with thermal induction, (○) XL1-Blue without thermal induction, (●) XL1-Blue with thermal induction.

아니라 깨어진 세포들의 입자가 탁도에 영향을 미친 것이라고 생각된다.

XL1-Blue(pSYL105)와 XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)의 경우, PHB의 축적이 거의 이루어지지 않은 상태인 대수기에서 같은 조건으로 실험하였을 때 위와 비슷한 실험결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4). XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)의 경우, 열적유도 후 초기 30분 동안은 OD_{600} 값이 0.6까지 증가하다가 1시간 후에 0.25로 낮아졌지만, XL1-Blue(pSYL105)의 경우에는 열적유도가 세포 성장에 별로 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있었다. 그러나, PHB 생합성 플라스미드가 없는 Fig. 3의 XL1-Blue(λ HL1)과 비교하면 OD_{600} 값의 감소가 조금 작았다. 이로부터 PHB가 생합성되지 않은 상태라도 균주 내에 플라스미드가 존재하여 외래 단백질(여기서는 PHA 합성효소)이 발현되면 열적유도에 의한 세포파괴가 약간 저해된다는 것을 알 수 있었다.

PHB가 축적된 후 열적유도에 의한 세포파괴

XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)를 12시간 배양하여 어느 정도 PHB가 축적되게 한 다음 열적유도를 하였을 때의 실험결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 열적유

Table 2. Cell lysis efficiency by three hours of thermal induction or by chemical induction after an hour of thermal induction. The efficiency was represented as $(C_{max}-C_{min})/C_{max}$ after the induction.

Strain	Induction point	Induction method	Efficiency(%)
XL1-Blue	OD ₆₀₀ =0.2	Thermal	No lysis
XL1-Blue(λ HL1)	OD ₆₀₀ =0.2	Thermal	87
XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)	OD ₆₀₀ =0.2	Thermal	58
	After 12h	Thermal	15
	After 24h	Thermal, Chemical ¹	92

1) 2%(v/v) chloroform treatment after 1 hour thermal induction.

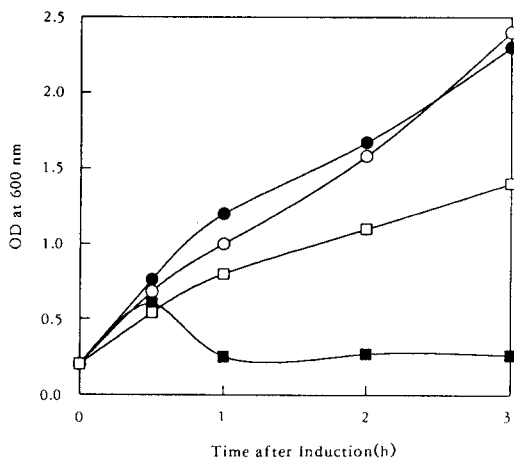


Fig. 4. Effect of a thermal induction on the cell lysis of XL1-Blue(λ HL1, pSYL105) when OD₆₀₀=0.2: (□) XL1-Blue(λ HL1, pSYL105) without thermal induction, (■) XL1-Blue(λ HL1, pSYL105) with thermal induction, (○) XL1-Blue(pSYL105) without thermal induction, (●) XL1-Blue(pSYL105) with thermal induction.

도를 하였을 경우 열적유도를 하지 않은 것과 비교해서 확실히 세포농도의 증가가 둔화되는 것을 알 수 있었다. 그러나, 대수기에서의 열적유도에 의한 세포파괴와 같이 급격한 세포파괴 현상은 일어나지 않았고 세포농도의 증가가 둔화되면서 약간의 세포파괴가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 세포파괴가 효과적으로 일어나기 위해서는 숙주세포 내에서 파아지 λ DNA가 효율적으로 발현되어 packaging 하는데 필요한 단백질이 적절하게 공급되어야 한다. λ HL1은 Q amber mutation(Qam73)된 것으로, 비록 사용된 숙주세포 XL1-Blue가 *supE* genotype을

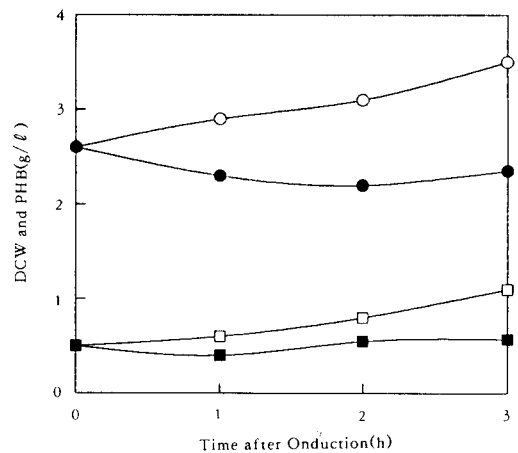


Fig. 5. Effect of a thermal induction on the cell lysis and PHB concentration of XL1-Blue (λ HL1, pSYL105) after a culture of 12 hours: (○) dry cell weight without thermal induction, (□) PHB without thermal induction, (●) dry cell weight with thermal induction, (■) PHB with thermal induction.

가지고 있어 amber mutation을 억제할 수 있다고 하여도, amber mutation되지 않은 파아지에 비해 packaging 효율이 낮은 것으로 보고되어 있다(12). 따라서, *cI₈₅₇*를 가지고 있고, amber mutation되지 않은 파아지를 이용한다면, 좀더 효과적으로 온도 감수성 파아지에 의한 세포파괴를 일으킬 수 있을 것으로 기대되어 진다.

PHB가 축적된 후 열적유도 및 화학적 유도에 의한 세포파괴

위 실험결과에서 알 수 있듯이 XL1-Blue(λ HL1,

pSYL105)를 배양하여 어느 정도 PHB가 축적된 상태에서 열적유도를 하였을 경우 만족할 만큼 세포파괴가 일어나지 않았다. 이 방법을 이용하여 PHB를 분리정제하기 위해서는 완전한 세포파괴를 일으킬 필요가 있는데 이를 위해 열적유도 및 chloroform이나 chloramphenicol을 첨가하는 화학적 용균을 병행하여 보았다. 세포파괴 효율을 $(C_{max}-C_{min})/C_{max}$ 로 정의하여 얻은 실험결과를 Table 2에 정리하여 나타내었다. 여기서 C_{max} 는 세포파괴가 일어나기 전의 세포농도(OD_{600})를 의미하고 C_{min} 는 세포파괴가 일어난 후의 가장 낮은 세포농도를 의미한다. 24시간 동안 균주를 배양하여 PHB가 축적되게 한 다음 1시간 동안 열적유도를 하고 $40\mu\text{g/ml}$ 의 chloramphenicol을 첨가하였을 때는 열적유도만 하였을 경우와 별 차이가 없었지만 열적유도 후 2%(v/v) chloroform을 첨가하였을 때는 급격하게 세포파괴가 일어나 거품이 생기면서 PHB와 일부 cell debris가 바닥에 가라앉고 배양액이 맑아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이때 세포파괴 효율이 92%로서 매우 효과적임을 알 수 있었다.

요 약

재조합 대장균에 의해 생합성된 PHB를 분리정제하기 위하여 박테리오파지의 세포파괴작용을 이용하는 방법의 가능성에 대해 알아 보았다. 먼저, cl_{857} 유전자를 지닌 박테리오파지 λ 를 대장균에 감염시킨 후 lysogen, XL1-Blue(λ HL1)를 선별하고, 이 균주에 PHA 생합성 플라스미드를 도입시켜 원하는 균주인 XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)를 만들었다. 숙주인 XL1-Blue, 열적유도에 의해 세포파괴가 가능한 XL1-Blue(λ HL1), 그리고 세포파괴와 PHB 생합성이 모두 가능한 XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)에 대하여 여러 가지 조건에서의 실험결과를 비교·검토하였다. XL1-Blue(λ HL1, pSYL105)의 경우 대수기에서는 열적유도만으로 세포파괴를 효과적으로 야기할 수 있었으나 PHB가 축적되는 정지기에서는 열적유도만으로 세포파괴를 일으킬 수 없었다. 세포파괴를 보다 용이하게 하기 위하여 열적유도 및 2%(v/v)의 chloroform을 사용하는 화학적용균을 병행하였는데, 이 경우 세포파괴가 효과적으로 일어남을 관찰할 수 있었다.

참고 문헌

1. J. A. Asenjo(1990), *Separation Processes in Biotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York.
2. S. T. L. Harrison, H. A. Chase, and J. S. Dennis(1991), *Bioseparation*, **2**, 155.
3. E. Berger, B. A. Ramsay, J. A. Ramsay, C. Chavarie, and G. Braunegg(1989), *Biotechnol. Techniques*, **3**, 227.
4. J. A. Ramsay, E. Berger, B. A. Ramsay, and C. Chavarie(1990), *Biotechnol. Techniques*, **4**, 221.
5. S. K. Hahn, Y. K. Chang, B. S. Kim, and H. N. Chang(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 256.
6. P. A. Holmes and G. B. Lim(1990), U. S. Patent 4910145.
7. J. I. Auerbach and M. Rosenberg(1987), U. S. Patent 4637980.
8. Chan-Shing Lin(1992), Ph. D. Thesis, University of California, Irvine.
9. F. Jacob and C. R. Fuerst(1958), *J. Gen. Microbiol.*, **18**, 518.
10. J. H. Campbell and B. G. Rolfe(1975), *Mol. Gen. Genet.*, **139**, 1.
11. R. Young, J. Way, S. Way, J. Yin and M. Syvanen(1979), *J. Mol. Biol.*, **132**, 307.
12. R. Y. Young(1992), *Virology*, **56**(3), 430.
13. S. S. Park and Y. M. Koo(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 1007.
14. A. J. Anderson and E. A. Dawes(1990), *Microbiol. Rev.*, **54**, 450.
15. H. Brandl, R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller(1990), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **41**, 78.
16. Y. Doi(1990), *Microbial polyesters*, VCH, New York.
17. S. Fidler and D. Dennis(1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 231.
18. S. Y. Lee and H. N. Chang(1995), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, in press.
19. S. Y. Lee and H. N. Chang(1994), *J. Environ. Polymer Degrad.*, **2**, 169.
20. S. Y. Lee K. S. Yim, H. N. Chang, and Y. K. Chang(1994), *J. Biotechnol.*, **32**, 203.

21. S. Y. Lee, K. M. Lee, H. N. Chang, and A. Steinbüchel(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1337.
22. S. K. Hahn, Y. K. Chang, and S. Y. Lee (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(1), 34.
23. D. Byrom(1987), *TIBTECH*, **16**, 32.
24. P. A. Holmes(1985), *Phys. Technol.*, **16**, 32.
25. S. Y. Lee and H. N. Chang(1994), *Bio Techniques*, **16**, 206.
26. J. Sambrook(1989), *Molecular cloning* 2nd ed. U. S. A.
27. G. Braunegg, B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty(1978), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29.