

Lipase를 생산하는 재조합 대장균의 phage에 의한 조절적 용균

문 윤 희 · † 구 윤 모
인하대학교 공과대학 생물공학과

Controlled Lysis of Lipase-Producing Recombinant *E. coli* by Phage Induction

Yun-Hee Moon and Yoon-Mo Koo[†]

Department of Biological Engineering, Inha University Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

A plasmid pTTY2, containing the lipase-producing gene, was used to transform an *E. coli* phage lysogen, P90c/ ϕ 434, into the lipase-producing lysogen, P90c/ ϕ 434/pTTY2. After the overproduction of lipase by the isopropylthio- β -D-galactoside induction, the prophage ϕ 434 in the chromosome of the host cell was induced by the mitomycin C addition or ultraviolet irradiation to lyse the host cell. The optimum operating conditions, such as the isopropylthio- β -D-galactoside induction period and the phage induction timing, were sought for the efficient cell lysis in the same fermenter. Effective cell lysis occurred at the earlier exponential growth phase with the isopropylthio- β -D-galactoside induction period of 1 hour. The amount of the lipase production was qualitatively measured by the halo size in Luria-Bertani agar medium containing tributyrin and Rhodamine B plate.

서 론

효소와 같은 생화학물질의 생산을 위한 숙주로서 재조합 대장균은 대부분 그 생산물을 세포 안에 축적한다. 이와 같은 세포 내 산물의 회수를 위해서는 세포파괴과정이 필요하며, 이 과정의 효율적 수행은 전체공정에 큰 영향을 미친다. 전통적인 세포파괴는 주로 물리적 방법, 화학적 방법 그리고 효소적 방법을 사용하는데 물리적 방법은 ball mill, French press, sonicator와 같은 고가의 장비를 필요로 하며, 화학적 방법과 효소적 방법 역시 화학물질과 고가의 효소 등을 사용하고 또 정제과정에서 이들을 다시 제거해야 하는 단점이 있다. 이러한 단점이 없

는 세포파괴 방법으로 UV조사에 의한 유도기작에 의하여 박테리아 세포에 잠재하고 있는(lysogeny) phage 유전자를 발현시켜 세포를 용해시키는 phage lysogen system이 개발되었다. UV조사 방법은 동일한 반응기 내에서 목적 단백질을 세포 외로 유출시키므로 공정이 단순하고 경제적 부담이 적은 장점이 있다. 한 예로서 본 실험실에서 개발된 *E. coli* double-lysogen system에서는 미생물이 동일한 반응기 내에서 β -galactosidase를 생산하였고, 그 후 phage에 의해 용해되었다(1).

Lipase는 일반적으로 동물, 식물, 곰팡이, 그리고 박테리아 등에 존재하여, 긴 사슬의 지방산 에스테르를 가수분해하여 글리세롤과 지방산을 만드는 반응을 촉진한다(2). Lipase는 세제, 유지 분해, 식품 첨가제, 의학, 정밀화학 등을 포함하는 여러 산업분

† Corresponding Author

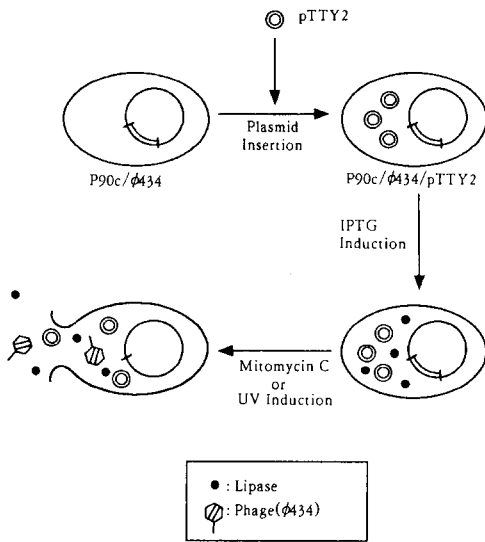


Fig. 1. Schematic representation of the synthesis of the recombinant single lysogen and the sequential enzyme production and the cell lysis.

야에서 유용하게 사용되고 있다(2).

본 연구에서는 lipase 유전자를 포함하는 plasmid pTTY2를 phage lysogen인 P90c/φ434에 transformation하여 재조합 phage lysogen(P90c/φ434/pTTY2)을 개발하였다(3)(Fig. 1). UV조사나 mitomycin C 첨가는 숙주 DNA를 손상시켜 rec A protein 양을 증가시킨다. Rec A protein은 숙주 DNA 내에 삽입되어 있는 phage 유전자를 숙주 세포질 내로 유도함과 동시에 phage DNA에 결합되어 있는 repressor를 제거함으로써 다량의 phage가 생성되어 미생물을 용해시킨다(4, 5). IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside) 유도로 pTTY2로부터 lipase를 과량발현한 후, φ434를 UV조사나 mitomycin C 첨가에 의해 유도함으로써 세포를 용해시켰다. 이상의 실험을 같은 반응기 내에서 순차적으로 수행하였고, 이 재조합 대장균에 대하여 IPTG 유도시점, 유도시간(IPTG로 유도한 후 phage 유도시기까지) 등의 최적용해조건을 구하였다.

재료 및 방법

재조합 대장균의 합성

Lipase를 생성하고 phage에 의해 용해되는 재조합 phage lysogen을 합성하기 위하여 멸균된 시험관 안에 0.2ml 발효액, 0.1ml φ434, 0.03ml 1M MgSO₄를 첨가하고 혼합하였다. 배양기에(32°C)에 15분간 넣어둔 후 3ml molten agar(50°C)와 0.03ml 1M MgSO₄를 첨가하여 혼합하였다. Bottom agar에 plating하고 실온에 10분간 놓아둔 후 32°C에서 배양하였다. 그 결과 형성된 turbid plaque를 취하여 멸균된 100μl SM buffer를 함유한 microfuge tube에 넣어 혼합하였다. LB agar 배지에 streaking한 후 37°C에서 12~16시간 배양하여 colony를 형성시킨다.

Plasmid pTTY2는 재조합 대장균, BL21/pTTY2를 alkaline lysis하여 얻었다(3). Competent cell(P90c/φ434)은 LB 3ml 배양액을 100ml LB 배지에 접종하여 37°C, 200rpm으로 배양기(incubator)에서 OD₆₀₀ 0.5가 되도록 배양한 후 0.1M MgSO₄와 0.1M CaCl₂를 처리했고 glycerol과 혼합하여 200μl 씩 microfuge tube에 분주하여 -70°C에 보관 사용하였다(3). 보관했던 competent cell은 얼음 위에서 녹인 후 plasmid(pTTY2)와 혼합한 것과 혼합하지 않은 competent cell을 얼음 위에서 15분간 방치, 42°C에서 1분간 열처리하였다. 다시 얼음 위에 15분간 두었다가 LB agar 배지와 LB(Amp^r) agar 배지에 50μl 씩 분주한 후 도말(spread)하였다.

플라스미드

재조합 플라스미드 pTTY2는 크기가 6.1kb인 pUC19 유도체로서 유전자 배열상에 lipase 유전자, tac promoter, ampicillin 내성 유전자, rrnB transcription terminator, 그리고 lacI^r가 존재한다(6)(Fig. 2). LacI^r에서 생성되는 repressor가 tac promoter에 결합되어 있으므로 IPTG로 유도될 경우 lipase가 생성된다. *Pseudomonas fluorescens* lipase 유전자는 호알칼리성과 내열성을 가지고 있어 최적 온도는 40~45°C이고 최적 pH는 8.0~9.0이다. Lipase 유전자를 클로닝하는 부분의 크기는 1.6kb이고 양끝에 Eco RI와 Pst I의 restriction site를 갖는다(6).

배지

균주접종을 위한 배지로는 LB 배지를 사용하였고 37°C, 200rpm에서 배양하였다. Esterase의 활성은 tributyrin이 함유된 LB agar 배지(LAT)를 사용하

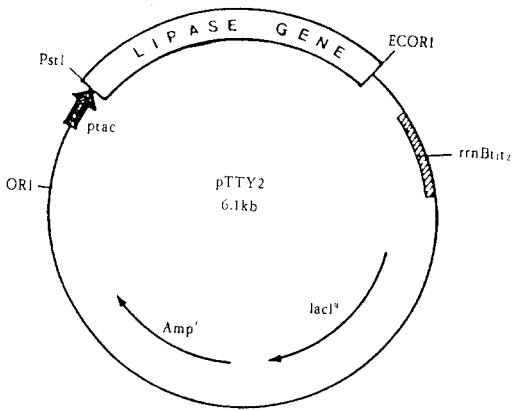


Fig. 2. The structure of recombinant plasmid pTTY2.

였고, lipase의 활성은 Rhodamine B agar 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. LB 배지는 Bacto-tryptone 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, 증류수를 넣어 1 liter 제조하였다. LAT 배지는 LB 배지에 0.5% (w/v) tributyrin을 넣어 1분간 sonication한 후 1.5% (w/v) agar를 첨가하여 멸균하고, 45~50°C가 되었을 때 ampicillin(50µg/ml)을 첨가하여 분주하였다. Rhodamine B 배지는 beef extract 3g, Bacto-tryptone 5g, NaCl 4g, agar 15g, olive oil 25g, 증류수를 넣어 1 liter로 만든 다음 pH 7로 조절하였다. 멸균한 후 방치하여 60°C가 되었을 때 0.01% (w/v) Rhodamine B 용액 10ml, ampicillin(50µg/ml)을 첨가하여 1분간 sonication하였다. 공기방울이 없어질 때까지 방치한 후 20ml씩 분주하였다.

아가로스 젤 전기영동

대장균(P90c/φ434)이 형질전환되었음을 확인하기 위하여 젤 전기영동을 하였다. 5×TAE buffer는 24.2g Tris base, 5.71ml glacial acetic acid, 10ml 0.5M EDTA(pH 8.0)의 수용액(1 liter)으로 제조하였다. 1×TAE buffer(50ml)에 0.35g agarose를 넣어 녹인 후 젤판 위에 분주하여 30~40분 후 젤이 굳으면 comb을 제거한다. 젤판을 tank buffer 속에 넣어 buffer를 젤 위 2~3mm까지 첨가하고 sample을 well에 주입하여 3시간 동안 전기영동(100V, 50mA)하였다. 본 전기영동 실험에서는 시료로 P90c/φ434와 P90c/φ434/pTTY2, 그리고 size marker로 λ DNA/Hind III fragments를 사용하였다.

Mitomycin C 첨가에 의한 용해

재조합 대장균은 37°C, 200rpm, 25ml LB 배지에서 배양하여 5µg/ml의 mitomycin C를 첨가함으로써 용해시켰다. Mitomycin C 2mg을 5ml 멸균 증류수에 녹여 400g/ml로 제조한 다음 0.45µm의 pore size를 가진 membrane으로 여과하여 냉장보관하였다. 배양액 9ml에 400µg/ml mitomycin C를 112.5µl 넣어 결과적으로 5µg/ml mitomycin C를 첨가하였다.

UV조사에 의한 용해

재조합 대장균을 용해시키기 위하여 25ml LB 배지에 재조합 대장균을 배양한 다음 알콜로 소독한 UV lamp(Pencil type, 254nm, 800µJ/cm²·sec, Spectroline)로 250rpm에서 90초 동안 조사하였다. Lamp는 LB 배양액으로부터 1cm 정도의 거리를 유지하였고, 재조합 대장균의 농도는 spectrophotometer(600nm)를 이용하여 측정하였다.

Lipase의 활성 측정

Esterase와 lipase의 활성은 각각 LAT 배지와 Rhodamine B 배지에서 형성되는 halo로써 확인하였다. LAT 배지와 Rhodamine B 배지에 만든 1cm 지름의 구멍에 UV 용해 후 원심분리하여 미생물을 제거한 상등액과, 용해되지 않은 미생물을 sonication시켜 깬 후 얻은 상등액을 각각 100µl씩 분주하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 냉장보관하였다. 미생물 농도가 OD₆₀₀ 0.5일 때 IPTG로 유도하여 4시간이 지난 후 UV를 조사하였다.

결과 및 고찰

재조합 대장균의 합성

Single lysogen을 합성하기 위하여 대장균 P90c에 φ434를 infection시켰으며, 이는 φ434가 P90c의 염색체에 삽입됨으로써 이루어진다. 목적하는 single lysogen은 P90c를 plating bacteria로 하고 φ434를 infecting phage로 한 plaque test에서 turbid plaque을 형성한다. Single lysogen의 합성 여부는 UV 또는 mitomycin C 유도에 의한 lysis 실험에 의해 확인하였다. Phage 용해를 위한 mitomycin C의 적정농도는 5µg/ml이고, UV인 경우 800µJ/cm²·sec의 세기로 90초 동안 조사하였을 때 세포용해현상을 관찰할 수 있었다(1, 5).

P90c/φ434를 competent cell로 만든 후 BL21/

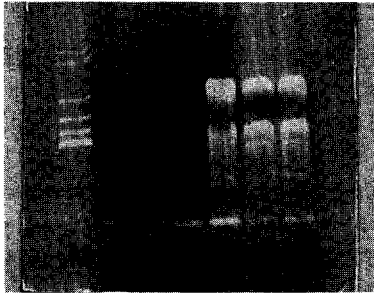


Fig. 3. Electrophoretic results of P90c/φ434 and P90c/φ434/pTTY2 with pTTY2 as a standard marker. Size marker; λ DNA/HindIII fragments, P90c/φ434; 1 lane(sample injection : 5μl), 2 lane(10μl), 3 lane(15μl), P90c/φ434/pTTY2; 4 lane(5μl), 5 lane(10μl), 6 lane(15μl).

pTTY2로부터 얻은 pTTY2를 transformation 하여 P90c/φ434/pTTY2를 합성하였고, 이를 전기영동, LB agar 배지와 LB(Amp⁺) agar 배지, 그리고 LAT 배지와 Rhodamine B 배지를 통해 확인하였다. P90c/φ434와 P90c/φ434/pTTY2로부터 plasmid 분리 과정을 거친 후 size marker로 DNA/Hind III fragments를 사용하여 0.7% agarose gel 에서 전기영동하였다. 전기영동 결과 해당 plasmid band가 P90c/φ434에서는 보이지 않는 반면, P90c/φ434/pTTY2에서는 나타남을 확인하였다(Fig. 3).

Transformation 후 competent cell과 합성된 재조합 대장균(P90c/φ434/pTTY2)을 LB agar 배지와 LB(Amp⁺) agar 배지에 50μl 씩 분주하였다. LB agar 배지에서 competent cell이 생존하였고, LB(Amp⁺) agar 배지에서는 재조합 대장균만 성장함을 보였다. P90c/φ434/pTTY2로부터 lipase의 생성확인으 LAT 배지와 Rhodamine B 배지에서 수행하였다. Esterase는 LAT 배지 내의 tributyrin 을, lipase는 Rhodamine B 배지 내의 olive oil을 각각 분해하여 Rhodamine B배지 내의 halo는 UV transilluminator 위에서 관찰되었다.

Lipase의 활성

P90c/φ434의 경우 halo 형성이 없었고, P90c/φ434/pTTY2는 용해시켜 얻은 상등액과 용해되지 않은 미생물을 물리적으로 깨서 얻은 상등액 모두 halo를 형성하였으며, 그 halo size는 비슷한 것으로

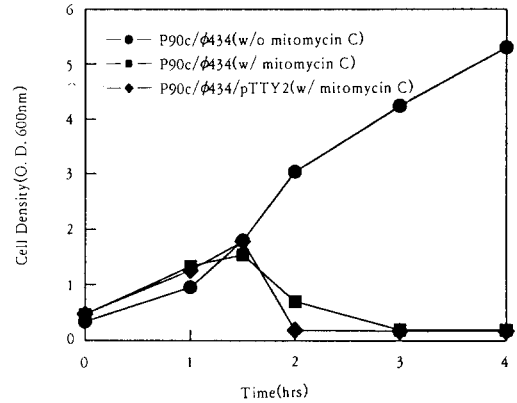


Fig. 4. Lysis of P90c/φ434/pTTY2, P90c/φ434 by mitomycin C addition at time zero.

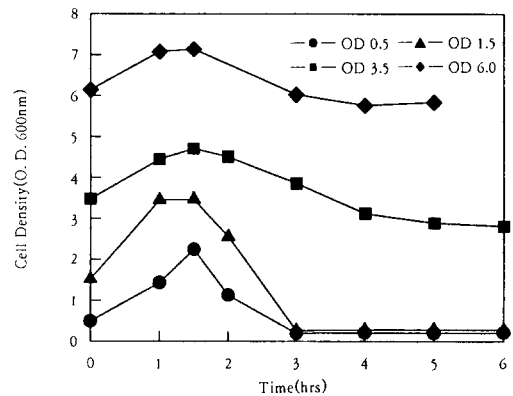


Fig. 5. Lysis of P90c/φ434/pTTY2, by the mitomycin C addition at time zero for various cell densities.

나타났다.

최적 IPTG 유도시기와 phage에 의한 용해시기

Phage에 의한 세포용해를 위해 숙주세포(P90c/φ434)를 합성하였고, Fig. 4에서 mitomycin C에 의한 용해경향을 보여 숙주세포로 적합함을 확인하였다. 또 P90c/φ434/pTTY2가 예측한 시간(90분 후 (1, 5))에 용해함을 관찰함으로써 plasmid pTTY2가 원하는 숙주(P90c/φ434)에 transformation되었음을 확인하였다.

Mitomycin C 첨가나 UV조사에 의한 미생물 용해경향을 Fig. 5와 6에서 각각 나타내었다. Phage에 의한 일반적인 용해현상으로 각 경우 미생물의

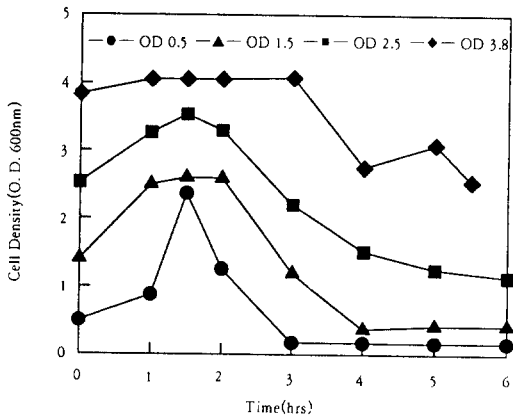


Fig. 6. Lysis of P90c/ ϕ 434/pTTY2 by the UV irradiation at time zero for various cell densities.

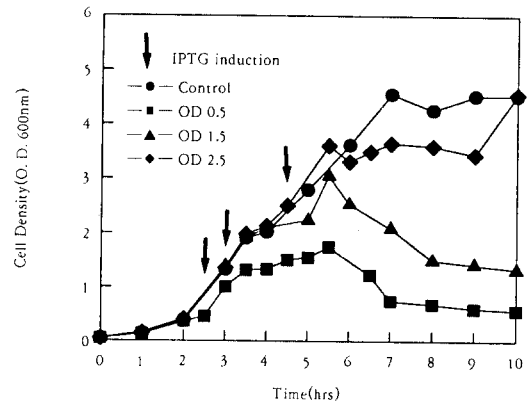


Fig. 8. Lysis of P90c/ ϕ 434/pTTY2 by the UV irradiation at one hour after IPTG induction for various cell densities.

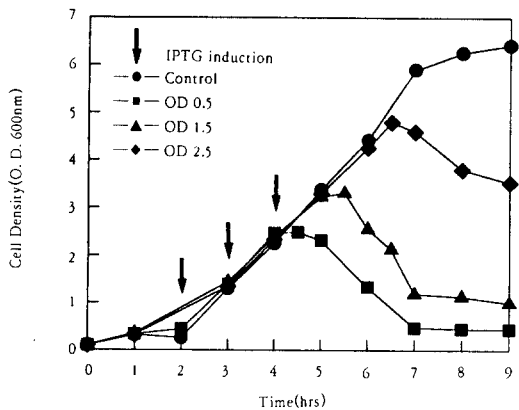


Fig. 7. Lysis of P90c/ ϕ 434/pTTY2 by the mitomycin C addition at one hour after IPTG induction for various cell densities.

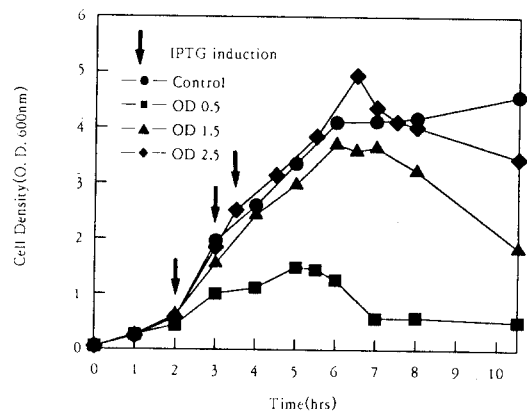


Fig. 9. Lysis of P90c/ ϕ 434/pTTY2 by the mitomycin C addition at two hour after IPTG induction for various cell densities.

농도 감소가 유도후 90분이 경과되었을 때 나타났다. 세포용해가 후기 exponential growth phase 이 전에서 활발하게 일어나는 것은 phage에 의한 용해의 일반적 특성으로 알려져 있다(1).

실제 lipase의 생산은 IPTG 유도에 의하여 진행된다. Fig. 7과 8은 lipase를 생산하기 위해 IPTG를 첨가한 후 1시간이 지났을 때 mitomycin C와 UV로 각각 유도하여 재조합 미생물의 용해경향을 보았다. Fig. 7은 세포농도가 OD 0.5(2hr), 1.5(3hr), 2.5(4hr)일 때 IPTG를 첨가하여 1시간 동안 발현시킨 후 OD 1.40(3hr), 2.41(4hr), 3.30

(5hr)에서 mitomycin C를 첨가하였다. Fig. 8에서는 세포농도가 OD 0.5(2.5hr), 1.5(3hr), 2.5(4.5hr)일 때 IPTG를 첨가하여 1시간 동안 발현시킨 후 OD 1.32(3.5hr), 2.10(4hr), 3.60(5.5hr)에서 UV조사 하였다. 두 경우 모두 초기와 중기의 exponential growth phase에서 세포용해가 일어남을 관찰하였다.

IPTG 유도시간이 세포용해에 미치는 효과를 Fig. 9, 10(mitomycin C 첨가), 11, 12(UV조사)에서 보았다. Fig. 9와 11은 IPTG를 첨가하여 2시간 동안, Fig. 10과 12는 4시간 동안 발현시킨 후의 용해경향

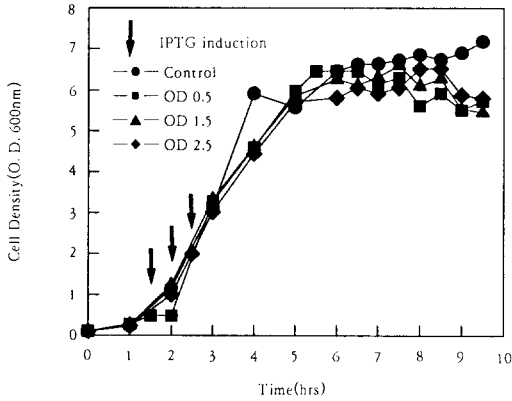


Fig. 10. Lysis of P90c/φ434/pTTY2 by the mitomycin C addition at four hour after IPTG induction for various cell densities.

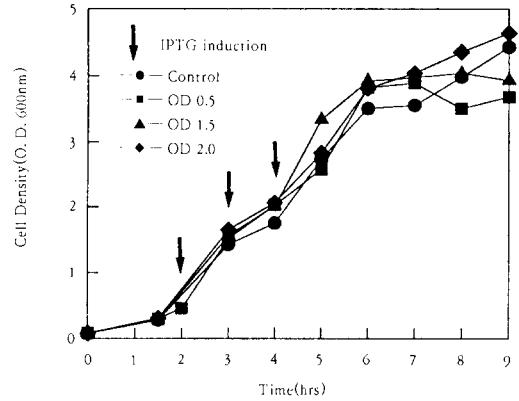


Fig. 12. Lysis of P90c/φ434/pTTY2 by the UV irradiation at four hours after IPTG induction for various cell densities.

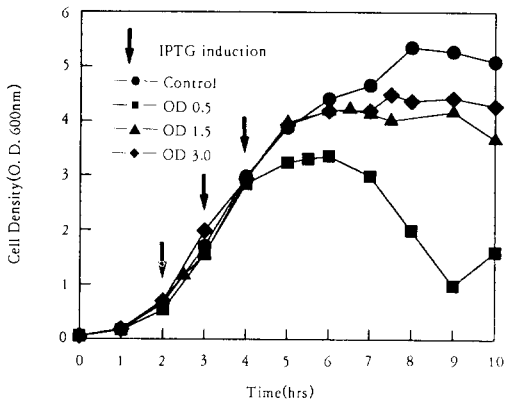


Fig. 11. Lysis of P90c/φ434/pTTY2 by the UV irradiation at two hours after IPTG induction for various cell densities.

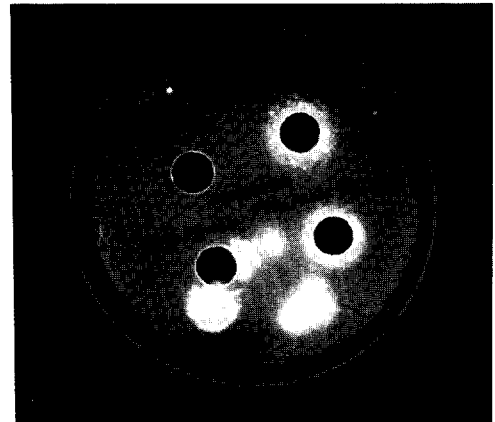


Fig. 13. Lipase activity for P90/φ434 and P90c/φ434/pTTY2 on Rhodamine B plate.

을 나타내고 있다. Fig. 9는 OD 0.5, 1.5, 2.5에서 IPTG 유도하여 mitomycin C를 첨가한 경우로 모두 용해경향을 보인 반면, Fig. 11에서는 OD 0.5인 경우에만 세포용해경향이 명확히 관찰되었다. IPTG 유도시간이 1시간일 경우와 비교하여(Fig. 7과 8), 유도시간이 길수록 용해성이 감소하여 IPTG 유도시간이 4시간일 때(Fig. 10과 12)는 미생물의 용해성이 거의 나타나지 않았다. 그러나 Fig. 12에서 UV 조사 후에도 미생물 농도는 감소하지 않지만 UV에 의해 영향을 받는 재조합 대장균이 있음을 lipase의 활성 실험을 통하여 확인하였다(Fig. 13).

IPTG 유도시간이 길수록 세포용해가 감소하는 현상은 세포용해를 위해 필요한 lysozyme, phage의 머리와 꼬리 등을 생성하기 위한 자원(아미노산 등)들이 lipase의 과량생산에 의해 고갈된 것으로 해석할 수 있다. 이외에도 IPTG 유도시간이 길수록 late exponential growth phase에 있는 미생물 수가 많아 화학물질이나 UV 등 환경의 변화에 민감하지 못하다는 점, 미생물 농도가 높아짐에 따라 단위 미생물에 대한 UV조사량이나 mitomycin C 첨가량의 상대적 감소 등을 그 이유로 들 수 있으나 정확한

설명을 위해서는 많은 이론적, 실험적 연구가 선행되어야 한다.

또한 전 실험을 통하여 UV조사보다 mitomycin C 첨가에 의한 세포용해가 더 효과적이라는 것이 실험을 통해 확인되었다. 그것은 UV조사 기간동안 ideal mixing의 가정이 실제로 이루어질 수 없다는 것과, 배양액 구성성분에 의한 UV흡수의 결과로 해석한다. Ideal mixing의 가정이 성립한다면, 조사된 UV는 배양액 내의 모든 미생물에게 동등한 영향을 미칠 것이다. 그러나 유해한 mitomycin C를 첨가하는 것은 바람직하지 않기 때문에 UV조사에 의한 효율적인 세포용해에 대한 연구가 진행되어야 한다.

이상의 실험결과로 미루어 보다 경제적이고 효율적인 lipase 생산을 위해서는, 고농도 세포에서 세포용해를 위한 미생물의 생리적 측면, 반응기의 운전적 측면에서의 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

Plasmid pTTY2에 의한 competent cell(P90c/ ϕ 434)의 형질전환에 의하여 lipase를 생성하는 재조합 대장균(P90c/ ϕ 434/pTTY2)을 합성하였다. Lipase 활성 조사를 위한 LAT plate, Rhodamine B plate를 이용한 실험에서 P90c/ ϕ 434의 경우 halo 형성이 없었고, P90c/ ϕ 434/pTTY2의 경우 용해시켜 얻은 상등액과 용해되지 않은 미생물을 물리적으로 깨서 얻은 상등액 모두 halo를 형성하였다. P90c/ ϕ 434/pTTY2에 대한 IPTG 유도시점, 유도시간이 ϕ 434에 의한 미생물 용해에 미치는 영향을 살펴봄으로써 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 재조합 대장균의 효과적인 용해는 OD₆₀₀ 0.5~2.5인 초기 exponential growth phase에서 IPTG로 유도한 후, mitomycin C 첨가나 UV조사에 의해 이루어진다.

2. 재조합 대장균의 용해는 IPTG 유도시간이 1시간일 때 가장 효과적이며, 이후 유도시간이 증가할수록 감소하여 유도시간이 4시간일 때는 세포용해가 이루어지지 않는다.

3. 실험한 범위에서 UV조사보다 mitomycin C 첨

가가 세포 용해에 더 효과적이다.

본 연구결과가 대규모의 생물공학 생산물의 정제에 응용되기 위해서는 고농도 세포에서의 세포용해에 대한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

감 사

본 연구는 1995년도 한국학술진흥재단의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. S. Park and Y. M. Koo(1994), *Biotech. Lett.*, **16**(10), 1007.
2. M. A. Taipa, M. R. Aires-Barros and J. M. S. Cabal(1992), *J. Biotech.*, **26**, 111.
3. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed, **3**(1), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
4. M. Ptashne(1986~1987), *A Genetic Switch Gene Control and Phage λ* , Cell Press & Blackwell Scientific Publications.
5. R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl and R. A. Weisber(1983), *LAMBDA II*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. G. H. Chung(1990), *Ph. D. Thesis*, Dept. of Biol. Sci. and Eng., KAIST.
7. G. Kouker and K. E. Jaeger(1987), *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(1), 211.
8. G. L. Christen and R. T. Marshall(1984), *J. Dairy Sci.*, **67**(8), 1680.
9. D. Lamotte, A. Gschaedler and J. Boudrant (1994), *Biotech. Lett.*, **16**(11), 1113.
10. B. E. Fischer(1994), *Biotech. Adv.*, **12**, 89.
11. A. Mitraki and J. King(1989), *Bio/Technology*, **7**, 690.
12. S. Janecek(1993), *Proc. Biochem.*, **28**, 435.
13. R. C. Hockney(1994), *TIBTECH*, **12**, 456.