

Phage Lysogen과 Expanded Bed Adsorption을 이용한 세포내 효소의 회수

장 우 진 · 윤 현 식 · † 구 윤 모
인하대학교 생물공학과

Recovery of Intracellular Enzyme Using Phage Lysogen and Expanded Bed Adsorption

Woo-Jin Chang, Hyun-Shik Yun, and Yoon-Mo Koo[†]

Dept. of Biological Engineering, College of Engineering, Inha Univ., Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

In the production of recombinant protein using *E. coli*, phage lysogen system can be usefully applied for simultaneously achieving protein production at high cell concentration and recovery by cell disruption in the same bioreactor. A major drawback of this system is that the intracellular product and complex broth components are mixed together in culture broth and hence purification efficiency is reduced. With the *E. coli* double-lysogen system, the expanded bed adsorption is very useful because the pre-treatment processes in a routine bioseparation process can be done in a single column operation, and therefore may contribute towards lowering the operating cost of overall recovery/purification process. In the operation of EBA, it has been observed that the change in broth feed volume does not influence much the protein recovery in a tested range. The amount of protein adsorption per mL of resin was increased from 3.44×10^6 unit to 5.28×10^6 unit by doubling the column length. By two-fold increase of the column diameter, the ratio of protein concentration in eluent to that in feed was increased from 0.8 to 2.1. It is concluded from the present investigation that the increase of column length and diameter is necessary to enhance the protein adsorption amount per volume of resin and protein concentration in the eluent. The development of resins with various physical properties will be necessary for more extensive application of EBA.

서 론

생물공학 기술에 의해 생산된 생물물질은 식품, 의약생산 등 산업적으로 많은 용도를 가지고 있으며, 그 중 특히 의약품으로 사용되는 여러 생물 물질의 경우, 가격이 비싸다는 것이 산업적 응용에 큰 장

애로 작용하고있다. 이러한 경제성의 문제에 있어서는 생산공정 중 분리·정제비용 과다가 가장 큰 요소 중의 하나로 지목되고 있다(1). 생물물질의 생산에 있어 분리공정의 개선을 통해 제품의 경제성을 향상시킬 수 있으며, 또한 분리공정의 간소화는 목적물질의 손실을 감소시켜 생산 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서 이러한 분리, 정제방법의 개선에 대한 연구가 다양하게 진행되어 왔다.

† Corresponding Author

여러 가지 공정 간소화 방법중 하나인 Expanded Bed Adsorption(EBA)은 기존의 fluidized bed를 이용한 방법의 단점을 보완하기 위해 고안된 것이다. Fluidized bed를 이용한 세포 배양액으로부터의 직접적인 분리방법은 1950년대에 이미 개발되었다(2). 이후 많은 연구가 있었으나 resin 종류의 한계성과 resin 종류에 따른 fluidization 특성의 유변성으로 인해 사용에 제약을 받아왔다(3). Fluidized bed reactor는 동일한 특성의 resin을 사용하므로 column내에서 resin이 일정한 방향성 없이 전 column을 통해 섞이게 되어, 목적물질과 resin의 흡착효율이 감소한다(4). EBA는 Fluidized bed의 이러한 단점을 보완하고, 흡착효율을 향상시키기 위하여 고안된 것으로, resin의 밀도와 크기에 변화를 주어 일정한 유속에서 각 resin이 column내의 일정한 위치에 체재하도록 한 것이다. 따라서 각 resin의 column내 유동이 감소하므로 fluidized bed reactor의 단점인 plug flow의 부재를 보완하여 흡착능력이 향상된다. 또한 정상상태에서 충전층과 달리 각 resin 사이가 넓어진 상태로 존재하여 그 사이를 cell, cell debris 등의 물질들이 이동할 수 있다. 이 공간을 통해 목적 단백질 이외의 물질이 통과하므로 잔류물질 제거를 위한 전처리 공정의 생략이 가능하다는 장점을 지닌다. 본 연구에서는 분리공정 단순화를 위한 시도로서, 동일 반응기 내에서 재조합 단백질 생산과 세포용해를 수행할 수 있도록 개발된 *E. coli* double-lysogen(P90c/(λ HLL1,434))(5)과 EBA를 연계한 새로운 분리기술에 대하여 연구하였다.

E. coli double-lysogen을 이용하여 동일 반응기 내에서 단백질생산과 세포용해를 수행하는 경우 세포내 생산물을 회수하기 위하여 세포를 분리한 후 파괴시키는 과정을 생략할 수 있다. 그러나 이 방법은 세포내 목적 단백질이 세포배양액과 혼재하게 되어, 발효액 중에서 목적 단백질을 선별적으로 분리해야 하므로 기존의 방법과 같이 세포를 분리한 후 용해시키는 과정보다 효율이 감소한다. 각종 배지와 세포내외 물질이 목적 단백질과 혼합되어 있는 double-lysogen 배양용액에 EBA를 적용함으로써 상기 double-lysogen계의 단점을 극복할 수 있다. EBA는 일반 packed column chromatography와는 달리 세포내 잔류물질 제거를 위한 전처리공정의 생략이 가능하므로, double-lysogen 용해의 결과로 얻어지는 발효액으로부터 추가공정 없이 직접 EBA를 통해 목적 물질의 분리를 수행할 수 있다.

이와 같이 double-lysogen을 이용한 세포 분리,

용해공정과, EBA에 의한 전처리 공정의 간소화는 생산비용을 감소시키고 목적 단백질 손실을 방지하여 최종 생산물의 경제성 향상에 기여할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 EBA column의 scale 변화에 따른 분리특성을 비교, 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험의 사용 균주인 *E. coli* double lysogen P90c/(λ HLL1,434)는 단백질 생산과 숙주세포 용해의 서로 다른 기능의 두 가지 prophage를 포함하고 있으며 각 prophage는 각각의 유도체에 의해 유도된다. λ HLL1은 단백질 생산을 위한 prophage로 온도증가에 의해 유도되며 세포내 목적 단백질 β -galactosidase의 과량 생산을 유도한다. Phage 434는 자외선에 의해 유도되며 숙주세포의 용해를 유도한다. 따라서 온도와 자외선의 연속적인 유도에 의해 목적 단백질인 β -galactosidase의 과량 생산과 세포용해를 수행한다(6).

생산배지로 LB배지를 사용하였으며 단백질 생산 및 세포용해는 jar fermentor(2.5L, 한국발효기 Co.)에서 working volume 700mL, 교반속도 100~150rpm, 포기속도 0.8vvm에서 수행하였다.

단백질 생산과 세포용해

적당한 세포농도에 이르기 전 prophage λ HLL1의 온도에 의한 유도를 막기 위하여 세포농도 OD600 0.5까지 32°C에서 배양한다. 세포농도 OD600 0.5에서 배양 온도를 42°C로 증가시켜 20분간 유지하며, 이 때 prophage λ HLL1에 의한 단백질 생산이 유도된다. 이후 배양온도를 37°C로 낮추어 배양하고, 적절한 시기에 배양용액 수면 위 1cm 지점에 설치된 살균 자외선 램프를 이용하여 자외선 강도 0.8mJ/cm².sec로 20분간 조사한다. 이 때 자외선의 균일한 조사를 위해 교반 속도를 300rpm으로 한다. 이상과 같이 자외선을 이용하여 prophage 434에 의한 세포용해를 유도한 후 7~9시간 동안 37°C에서 배양하여 세포용해를 수행한다.

β -Galactosidase 활성 측정

β -Galactosidase 활성은 발색기질 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(oNPG)를 이용하여 Miller(7)에 의해 제시된 방법으로 측정하였다. 효소의 활성 단위(1unit)는 28°C에서 1분 동안 1nmole의 oNPG

Table 1. Dimensions of the Columns and Experimental Conditions.

	G22×250	G22×500	VL44×250
Diameter(cm)	22	22	44
Packed bed height(cm)	6	12	6
Packed bed volume(mL)	22.8	45.6	91.23
Flow rate(mL/min)	19	19	76
Expanded bed height(cm)	15-18	30-36	15-18
Expansion ratio	2.5-3	2.5-3	2.5-3

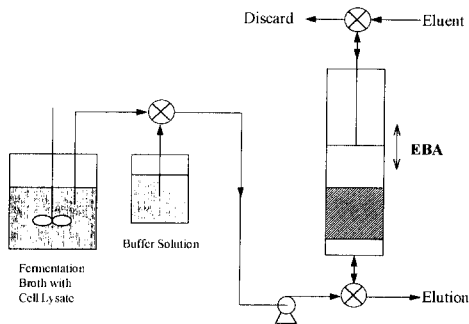


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental equipments.

를 변환시킬 수 있는 효소의 양으로 정의된다. 세포의 효소 활성은 8000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포와 세포잔해를 제거한 후 상등액에서 상기의 방법으로 측정하였다.

Column과 Resin

세 가지 크기의 column에서 사용 bed의 높이를 2배로 하여 부피가 2배인 경우와 지름을 2배로 하여 부피가 4배인 경우로 달리하여 비교하였다. 각 column은 Amicon사의 G22×250, G22×500, VL44×250 column으로 그 특성 및 실험조건은 Table 1과 같다. 용액의 유속은 column내에서 수면의 상승 속도가 30cm/h가 되도록 설정하였다. 각 유속에서 bed는 2.5~3배의 부피 증가를 보인다.

Resin은 Pharmacia사의 STREAMLINE DEAE EBA용 resin으로, 자체적으로 양전하를 가지며 음전하를 갖는 물질을 이온 교환법에 의해 분리할 수 있다(8).

EBA chromatography의 운전

EBA column에 의한 분리는 4단계로 나타낼 수 있다(8). 침강된 상태에서 완충용액을 상방향으로

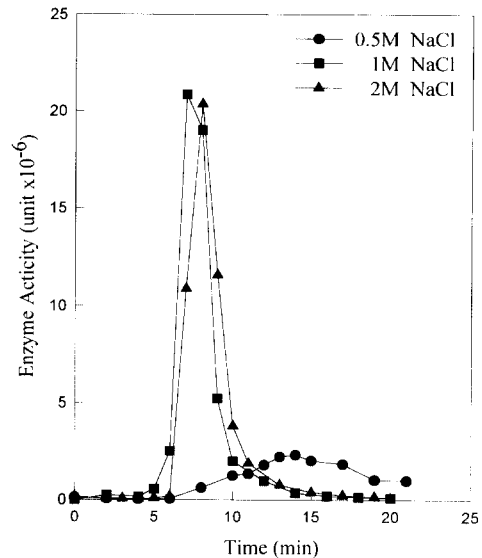


Fig. 2. Elution curves with various eluent concentrations in G22×500 column.

흘려주어 packing된 resin을 팽창시킨다. 이후 배양액을 주입하여 흡착을 유도하고, 적절한 시기에 배양액 주입을 멈추고 완충용액으로 미흡착 잔류물질을 충분히 제거한 후 용액의 흐름을 중단시키면 resin이 침강되어 packing 상태로 존재하게되며, 이때 column 팽창시와 역방향으로 용리액을 흘려주어 흡착된 단백질을 용리시킨다. 용리시 각 resin은 침강되어 packing된 상태로 존재하므로 packed column chromatography에서와 같은 용리특성을 나타낸다.

E. coli double-lysogen에 의해 생산된 세포 배양 용액의 pH는 약 8.5이다. β -Galactosidase는 pI가 약 5.5로, pH 5.8 용액 내에서 충분히 음전하를 띠므로(9) 1M HCl 용액으로 세포 배양 용액의 pH를 5.8로 하였으며, 양전하를 띠는 resin을 이용하여 Fig. 1에 도시된 바와 같은 EBA 장치에서 흡착 및 분리 특성을 연구하였다.

결과 및 고찰

용리액 농도 및 배양용액 주입량에 따른 분리특성 흡착된 단백질의 용리는 단백질과 용리액의 charge 및 이온강도 등의 영향을 받는다. 본 실험에서는 용리후 제거가 비교적 용이하고 독성이 없어

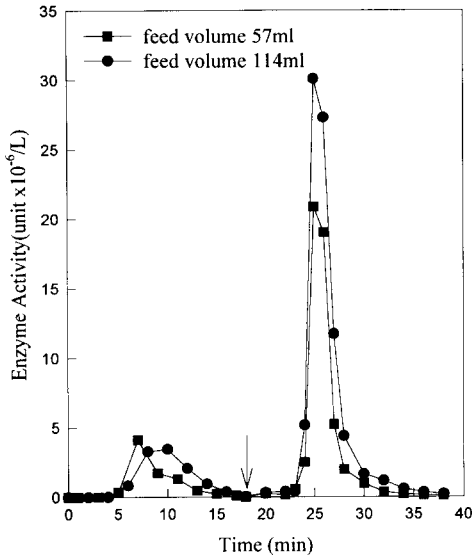


Fig. 3. Elution curves with various amounts of feeding broth in G22×500 column. The arrow indicates starting point of elution.

용리액으로 많이 사용되는 NaCl 용액을 용리액으로 선정하였으며, G22×500 column에서 용리액의 유속은 6mL/min로 하고, NaCl 농도에 따른 용리특성을 비교하였다(Fig. 2). 용리액으로 0.5M NaCl 용액을 사용한 경우 peak의 높이가 낮고 체류시간이 길며 뒷부분에서 tailing 현상을 보인다. 이러한 결과로 볼 때 0.5M NaCl 용액은 β -galactosidase와 STREAMLINE DEAE resin의 결합을 용리시키는 데 필요한 적정농도보다 낮은 것으로 판정된다. 1M과 2M NaCl 용액을 사용한 경우 peak 높이와 체류시간에서 유사한 결과를 보였다. Peak 모양은 1M의 NaCl 용액을 사용한 경우 2M NaCl 용액에 의한 용리곡선보다 tailing이 길고 앞부분의 peak가 급격히 증가하는 경향을 보이나, 1M 이상의 NaCl 농도에서는 용리특성에 큰 차이가 없는 것으로 사료된다.

G22×500 column에서 배양액의 주입 유속을 19mL/min으로 동일하게 유지하면서 주입시간을 변화시켜 주입량을 114mL와 57mL로 하였을 때 흡착 및 용리 특성을 Fig. 3에 도시하였다. 주입되는 배양액의 감소에 의해 흡착되지 않고 용출되는 효소의 양이 감소하고, 용리곡선의 높이와 폭이 감소하였다. 주입량이 50% 감소하였을 때 용리되는 양은 용리곡

선의 넓이를 비교할 때 50% 감소하였다. 따라서 실험한 범위의 주입량 변화시, resin에 흡착되는 효소량은 주입량 감소비율과 동일 비율로 변한다는 것으로 볼 때, 동일 유속에서 주입량에 대한 흡착되는 효소량의 비율은 일정한 것으로 사료된다.

Column에 따른 분리특성

세 가지 종류의 column에서 G22×250 column을 기준으로 하고, column 높이와 지름을 증가시켜 부피의 변화에 따른 특성을 관찰하였다. 각각의 경우 column 팽창에 필요한 적정 유속을 유지하며 모액을 주입하였다. Resin 부피에 비례하여 G22×250 column은 유속 19mL/min으로 3분간 57mL, G22×500 column은 유속 19mL/min으로 6분간 114mL, VL44×250 column은 유속 76mL/min으로 3분간 228mL를 주입하였다. 용리액은 1M NaCl 용액을 사용하였으며 용리액의 유속은 6mL/min으로 하였다.

G22×250 column을 이용하였을 때 resin에 흡착되지 않은 효소는 4분에서 peak를 이루며 3~7분에 걸쳐 용출되었다. 흡착되지 않은 효소를 완충 용액으로 충분히 세척한 후 14분 이후에 용리시켰다. 용리 peak는 21분에 나타나 체류시간은 7분이었다. 높이의 증가에 의해 G22×250 column에 비해 부피를 2배 증가시킨 G22×500 column에서는 흡착되지 않은 효소는 6~15분 사이에 나타났으며, peak는 모액 주입 9분 후 나타났다. 22분 이후에 용리시킨 결과 용리시 체류시간은 7분이었다. VL44×250 column을 이용하여 지름을 2배 증가시킴으로써 부피를 4배 증가시킨 경우, 흡착되지 않은 효소의 용출 시간은 3~7분 사이이며, peak는 4분에 나타났다. 14분 이후 용리시킨 결과 용리시 체류시간은 20분이었다.

G22×250 column과 bed의 높이가 같고 지름이 2배인 VL44×250 column에서 흡착되지 않은 효소의 용출시간이 약 4분으로 같았고, 지름이 같고 높이가 2배인 G22×500 column에서는 미흡착 단백질의 용출시간은 약 9분으로 약 2.3배의 용출시간 증가를 보였다. 세 경우 모두 용리곡선 뒤쪽에서 peak의 tailing 현상이 나타나는데 이것은 용리액의 농도와 유속을 조절하여 최적의 조건을 찾음으로써 해소될 수 있을 것으로 사료된다.

1M NaCl 용액을 이용하여 유속 6mL/min로 용리하였을 때 세 column에서의 용리특성을 다음에 요약, 비교하였다(Fig. 4). G22×250 column에 비해

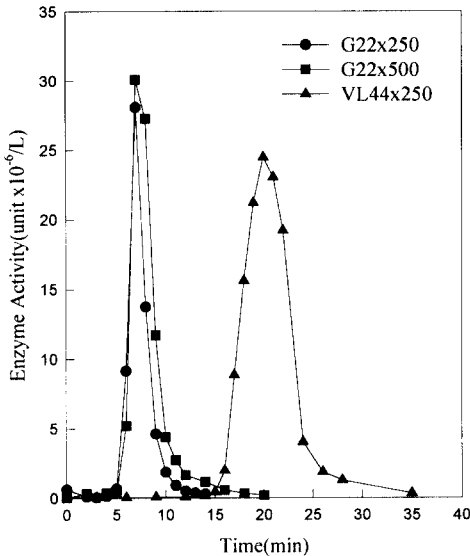


Fig. 4. Elution curves with G22×250, G22×500, VL44×250 column after elution is initiated (Eluent: 1M NaCl, Flow rate: 6mL/min).

높이를 2배 증가시킨 G22×500 column의 경우 체류시간이 약 7분으로 유사하였다. 그러나 peak의 tailing 현상이 발생하는 것으로 볼 때 G22×500 column에서 용리액의 농도가 필요농도보다 낮은 것으로 생각된다. 지름이 2배인 VL44×250 column은 체류시간이 20분으로 약 3배 증가하였다. VL44×250 column의 경우 peak의 최고 enzyme activity가 낮고, 넓이도 나머지 두 column의 경우보다 넓으며 체류시간도 3배 정도이다. 이것은 부피 증가에 비해 용리액의 유속이 너무 낮았기 때문인 것으로 생각된다.

이상의 실험을 기준으로 각 column에서의 흡착 및 분리 특성을 Table 2에 나타내었다. 주입농도의 10%인 농도로 용리되는 시간범위 사이에서 용리액을 회수하여(line 5), 주입된 배양액의 enzyme activity(line 1)에 대한 용리액 enzyme activity(line 3)의 비율을 농축비로 정의하였다. 농축비는 VL44×250 column이 2.10으로 가장 높았으며 G22×250 column의 경우 오히려 희석되는 경향을 보였다. 이것은 resin에 결합하지 않고 단백질이 손실되었고, 주입액에 대한 용리액의 부피비가 다른 column의 경우보다 크기 때문에 나타난 결과로 판

Table 2. Adsorption and Elution Properties in Various Columns.

	G22×250	G22×500	VL44×250
Input unit(×10 ⁻⁶ /L)	3.94	3.94	4.20
Input volume(mL)	28.5	57.0	76.0
Eluent unit(×10 ⁻⁶ /L)	3.14	5.60	8.84
Eluent volume(mL)	24	42	54
용리중 회수 시간범위(min)	5-9	5-12	16-25
농축비	0.80	1.42	2.10
Resin 단위부피(1mL)당 효소			
흡착량(unit x10 ⁻⁶ /L)	3.44	5.28	4.26

단된다. 사용한 resin 단위부피(1mL)당 흡착되는 단백질의 양은 G22×500 column을 사용한 경우 5.28unit으로 가장 많았다. 상기의 결과로 농축비의 증가에는 column 지름의 증가, 단위 resin 당 흡착량의 증가에는 column 높이의 증가가 유리하다고 판단된다.

요 약

Phage lysogen계는 동일 반응기 내에서 단백질 고농도 생산과 세포파괴를 수행할 수 있는 장점을 가지나, 배양액내 다양한 배지성분과 세포내의 물질이 혼재하게 되어 분리, 정제 공정에서의 효율이 감소되는 단점이 있다. 본 실험에서는 이러한 *E. coli* double-lysogen 계의 단점을 Expanded Bed Adsorption을 적용함으로써, 세포분리 및 세포파괴 공정과, 잔류물질 제거를 위한 전처리 공정을 간소화할 수 있었다. 이러한 공정의 간소화를 통해 생물공학 적 제품 생산시 생산비용의 감소와 생산효율 증대를 이룰 수 있을 것으로 생각된다.

EBA의 운전에 있어 배양용액의 주입량을 1/2로 감소시키는 경우 resin에 흡착되지 않고 손실되는 단백질과 흡착후 용리되는 단백질량이 모두 감소하여 실험한 범위에서 주입량 감소에 의한 영향은 없는 것으로 나타났다.

Column 길이를 2배 증가시킨 경우 resin 1mL당 흡착되는 단백질 양이 3.44×10⁶unit에서 5.28×10⁶unit으로 65% 증가하였으며, column 지름을 2배 증가시키는 경우 용리액의 농축비가 0.8에서 2.1로 증가하였다. 따라서 resin 단위 부피당 흡착량의 증가를 위해서는 column의 길이를 증가시키는 것이 필요하며, 높은 농도의 용리액을 얻기 위해서는 column의 지름을 증가시키는 것이 적절하다고 판단된다.

EBA의 광범위한 사용을 위해서는 목적 단백질에 적합한 물성을 갖는 resin의 개발이 중요하며, 주어진 상황에 따른 운전 조건의 최적화가 필요하다고 판단된다.

감 사

본 연구는 통상산업부 청정생산기술개발사업연구 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. M. P. Deutscher(1990), Guide to protein purification, Academic Press Inc., California.
2. C. R. Barthels, G. Kleinman, J. N. Korzon, and D. B. Irish(1954), *Chem. Eng. Prog.*, **54**(8), 49.
3. M. Hansson, S. Stahl, R. Hjorth, M. Uhlen, and T. Moks(1994), *BIO/TECHNOLOGY*, **12**, 285.
4. H. A. Chase(1994), *TIBTECH*, **12**, 296.
5. S. S. Park and Y. M. Koo(1994), *Biotechnology Letters*, **6**(10), 1007.
6. Y.-M. Koo, B. S. Parekh, G. W. Hatfield, and H. C. Lim(1996), *Kor. J. of Chem. Eng.*, **13**, 202.
7. J. Miller(1972), Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
8. A.-K. B. Frej, R. Hjorth, and A. Hammarstrom (1994), *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 922.
9. M. H. Heng and C. E. Glatz(1993), *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 333.