

Chlorphenesin Galactoside Production using Immobilized β -galactosidase-producing *Escherichia coli*

Kyung-Hwan Jung*

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Korea

Received June 24, 2015 / Revised September 1, 2015 / Accepted September 10, 2015

Previous research showed that chlorphenesin galactoside (CPN-Gal), a preservative in cosmetics, was safer than CPN against human skin cells [9]. To establish a stable and long-term process for CPN-Gal production, we investigated the repeated-batch process. In this process, β -gal-producing recombinant *Escherichia coli* cells were immobilized in calcium alginate beads, and CPN was converted to CPN-Gal by the transgalactosylation reaction. The process was conducted in a 300 ml flask, which contained *E. coli* cell-immobilized alginate beads, 33.8 mM of CPN, and 400 g/l of lactose. The pH and temperature were 7.0 and 40°C, respectively. During the repeated-batch operation, four consecutive batch operations were conducted successfully until 192 hr. The conversion yield of CPN to CPN-Gal was 64% during 192 hr, which was higher than the values in previous reports [3, 13]. Thereafter, however, the conversion yield gradually decreased until the operation was finished at 336 hr. Western blotting of immobilized *E. coli* cells revealed that β -gal gradually decreased after 192 hr. In addition, alginate beads were cracked when the operation was finished. It is probable that, including this loss of *E. coli* cells by cracks, deactivation, and product inhibition of *E. coli* β -gal might lead to a gradual decrease in the production of CPN-Gal after 192 hr. However, as the purification of β -gal is not necessary with β -gal-producing recombinant *E. coli* cells, β -gal-producing *E. coli* cells might be a practical and cost-effective approach for enzymatically synthesizing CPN-Gal. It is expected that this process will be extended to long-term production process of CPN-Gal for commercialization.

Key words : Alginate bead, β -galactosidase, chlorphenesin, *Escherichia coli*, immobilization

서 론

β -Galactosidase (β -gal)을 이용하여 생리적으로 활성이 있는 물질에 galactose 분자를 붙여서 생리활성 물질의 단점을 보완하려는 많은 연구가 진행되어 왔다. Galactose를 생리활성 물질에 결합시키면 독성이 감소하고, 물에 대한 용해도가 증가하고, 약물 표적효과의 전달능력이 향상되는 것으로 알려져 왔다[2, 5, 12, 14]. 본 연구팀에서는 그 동안 β -gal을 생산하는 재조합 *Escherichia coli*(*E. coli*)를 이용하여 화장품 등에서 살균방부제로 사용되어지는 chlorphenesin (CPN)과 phenox-yethanol (PE) 분자에 galactose 한 분자를 붙이는 trans-galactosylation 반응을 수행하여 CPN과 PE의 단점을 극복하려는 연구를 수행하였다[7, 9, 10, 11]. 이러한 CPN과 PE의 분자에 galactose 분자를 결합시킴으로서 피부세포에 대한 안전성이 증가된 화장품용 살균방부제를 합성할 수 있었다.

본 연구에서는 β -gal을 생산하는 *E. coli*를 여러 번에 걸쳐 반복 사용하고, 최종 반응물에서부터 *E. coli*를 회수해야 하는 불편함(회수하지 않으면 최종산물인 CPN-Gal의 정제수율과 순도를 감소시킬 수 있음)을 감소시키기 위하여 β -gal을 생산하는 *E. coli*를 고정화시켜 CPN으로부터 chlorphenesin galactoside (CPN-Gal)로의 전환반응을 수행하는 실험을 실시하였으며, 이 때 실험 결과에 나타난 현상을 분석하였다.

재료 및 방법

시약

CPN은 CosMol Co. (Siheung, Korea)에 제공해주셨으며, western blotting 용 시약은 아래와 같다; SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Hyperfilm Enhanced Chemiluminescent (ECL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra, GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)). 또한 이 때 사용한 항체는 rabbit anti- β -galactosidase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Abcam, Cambridge, UK) 이다. 그리고, 기타 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-43-820-5246, Fax : +82-43-820-5272

E-mail : khjung@cjnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

β-Gal을 생산하는 재조합 E. coli

*E. coli*의 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 pBAD/*Myc-His/lacZ* vector (7.2 kb)를 사용하여 *E. coli* MC1061를 발현 숙주로 하여 β-gal을 발현하였다. 재조합 *E. coli* 제작에 대한 사항은 선행연구에서 자세히 언급하였다[6, 8]. 또한, 재조합 β-gal을 함유한 *E. coli*의 배양방법에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기록하였다[6, 8].

Alginate bead에 E. coli 고정화

선행연구에서 실시한 방법으로 *E. coli*를 발효조를 이용하여 배양한 후[6-11], 배양액 45 ml과 같은 부피의 6% sodium alginate 용액을 250 ml beaker에 넣고 섞어준다. 그리고 새로운 250 ml beaker에 1% CaCl₂ 용액을 100 ml 정도 만들고, 배양액과 sodium alginate 용액의 혼합액을 5 ml syringe에 23G needle을 이용하여 1% CaCl₂ 용액에 점적하여 *E. coli*가 고정화된 calcium alginate bead를 만들었다. 이 때 10 ml의 혼합액으로 약 300개 정도의 bead를 만들고, 45분간 경화시킨 후, 1% CaCl₂를 버리고 증류수로 세 번 헹군 후, 이 bead를 모두 반복 회분식 반응에 사용하였다.

CPN-Gal 생산을 위한 반복 회분반응

300 ml flask에 *E. coli*가 고정화된 bead와 반응액 40 ml (400 g/l lactose, 33.8 mM CPN, 100 mM Tris buffer, pH 7.0)를 섞은 후, CPN에서 CPN-Gal로의 첫 번째 전환 반응을 48시간 동안 실시하였다(40°C, 60 rpm). 그 후 48시간마다 새로운 반응액으로 교체하여 반복적인 회분반응을 실시하였다. 각 회분배양의 시작과 끝에 반응 상등액을 채취하여 CPN과 CPN-Gal 양을 HPLC (high performance liquid chromatography, YL 9100 system; Younglin, Seoul, Korea)로 분석하였다. 이 때 30% acetonitrile을 이동상으로 하여, C₁₈ column (Hypersil GOLD, 150×4.6 mm, particle size 5 μm; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)으로 분석하였다. 기타 자세한 분석 조건은 선행연구에서 언급하였다[9, 11].

Western blotting

Bead 30 알을 채취하여 1 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 넣고 bead를 완전히 파쇄/용해 한 후, 2 ml micro-

tube에 담아서 원심분리(13,000 rpm, 5 min)를 하고 cell pellet 만을 채취한다. 그 후, 선행연구[9]에서 실시한 방법으로 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리한 후, 각각의 시료를 가지고 anti-β-gal 항체를 이용하여 western blotting을 실시하였다.

결과 및 고찰

선행연구 결과에서 Fig. 1과 같이 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환반응이 β-gal을 생산하는 *E. coli* 세포를 사용하여 일어날 수 있다는 것을 확인하였다. 본 연구팀에서는 CPN으로부터 CPN-Gal을 장기간에 걸쳐 생산하기 위하여 β-gal을 생산하는 *E. coli* 세포를 고정화 시키는 연구를 수행하였다. 이 때 alginate bead 안에 *E. coli* 세포를 고정화시키는 방법과 Cellite 표면에 *E. coli* 세포를 흡착시켜 고정화시키는 두 가지 방법에 대하여 조사하여 보았다. 그런데 Cellite 표면에 *E. coli*를 흡착시키는 방법에서는 *E. coli* 세포가 효율적으로 표면에 잘 달라붙는 조건으로 세포를 고정화시켰으나, CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환반응을 실시하는 중에 매우 빠른 속도로 세포가 Cellite 표면에서부터 떨어져나가는 현상이 관찰되어 (data not shown), 본 연구에서는 alginate bead를 이용하여 β-gal을 생산하는 *E. coli*를 고정화시키고, 이를 이용하여 반복적인 회분반응을 장기간에 걸쳐서 수행하는 연구를 실시하였다.

β-gal을 생산하는 *E. coli*가 고정화된 alginate bead와 기질인 CPN (평균 33.8 mM)을 혼합하여 336시간 동안 반복적인 회분반응을 실시하였다(Fig. 2). 이 기간 동안 총 7회에 걸친 회분반응을 실시하였으며, 각 회분반응은 48시간 단위로 수행되었다. Fig. 2에서와 같이 네 번째의 반응이 끝난 192시간까지는 19.6-22.3 mM의 CPN-Gal이 생성되어, CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환수율이 평균 64.9%(처음부터 4회까지 회분반응 평균) 정도를 보였다. 본 연구팀의 선행연구[9, 11]에서도 64-67% 정도의 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환수율이 이미 확인되었기 때문에, 본 연구에서 alginate bead를 이용한 4회까지의 회분반응에서는 어떠한 문제도 없이 잘 진행되었다고 할 수 있다. 이미 보고된 두 논문에서 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환수율이 15%(β-gal from *Kluyveromyces lactis*,

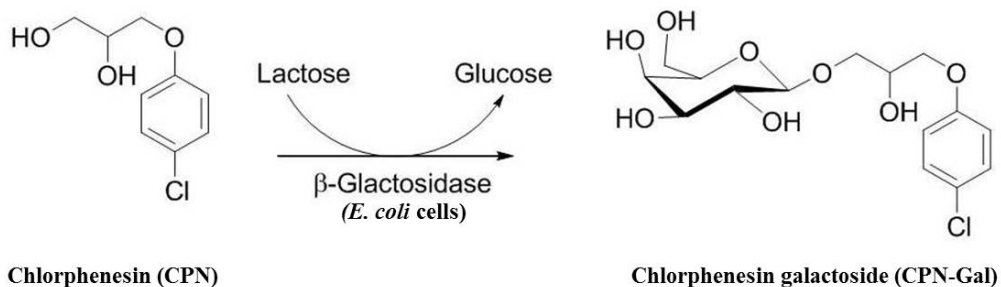


Fig. 1 Enzymatic galactosylation of CPN using *E. coli* β-gal.

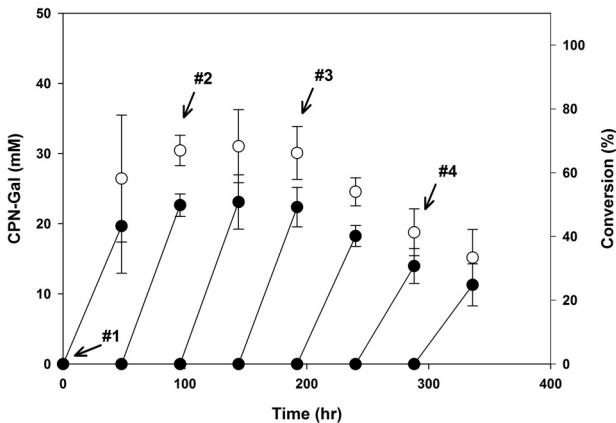


Fig. 2. CPN-Gal production (●) and conversion yield (○) from CPN to CPN-Gal during repeated-batch operation using immobilized *E. coli* β-gal. Conversion(%) indicates the percent conversion of CPN to CPN-Gal. Cells were immobilized in calcium alginate beads. CPN was supplied at 33.8±1.9 (mM) before each batch operation. Samplings for Western blotting were conducted at #1, 2, 3, and 4, where the elapsed times were 0, 96, 192, and 288 hr, respectively. All measurements were made three times using the same sample, and mean and standard deviation were calculated.

Lactozym 3000 L HP-G)와 12.5%(β-gal from *Aspergillus oryzae*)라고 보고하고 있다[3, 13]. 본 연구에서는 alginate bead를 이용하여 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환을 시도하였지만, 이미 보고된 두 논문과 비교하여서도, 더 높은 전환수율을 보여 주었다.

현재까지 고정화 *E. coli*를 이용하여 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환을 시도한 보고가 없고, 또한 이를 이용하여 반복적인 회분반응을 시도하여 CPN-Gal을 만든 선행 보고도 없었다. 본 연구에서 β-gal을 생산하는 *E. coli*를 고정화 시켜서 CPN-Gal을 생산하려는 첫 번째 시도는 앞으로 상업적인 생산을 위한 기초적인 기반연구 결과를 제공하고, 안정적인 연속 생산 가능성을 확인 시켜주는 결과를 제공한다는 의미에서 매우 중요하다고 생각된다.

그런데, 네 번째 회분반응이 끝난 192시간 이후부터 336시간까지는 점진적으로 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환이 감소하는 현상이 관찰되었다. 이러한 192시간 이후의 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환수율 감소현상에 대한 원인을 분석하기 위하여 먼저 Fig. 3와 같이 회분반응 중의 일부 alginate bead를 채취하여 Western blotting을 통하여 *E. coli* 안의 β-gal을 분석하여 보았다. 그 결과 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환수율이 감소되는 시점인 192시간 이후부터는 점진적으로 bead 안의 β-gal 양이 감소되는 현상을 관찰되었다(#3 in Fig. 3). 이러한 현상은 bead 안의 *E. coli* 세포 자체가 bead로부터 유출되어 손실되거나, 혹은 *E. coli* 세포 안의 β-gal이 불활성화되어서 발생할 수 있다고 생각할 수 있다. 또한, CPN에서

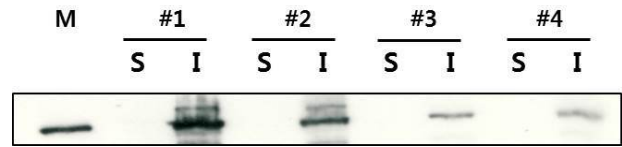


Fig. 3. Western blot analyses of samples harvested during repeated-batch operation. Sample numbers are described at the top of each image. M, S, and I are β-gal standard (Sigma), soluble, and insoluble fractions from immobilized *E. coli* cells, respectively.

CPN-Gal로의 전환수율이 감소 원인으로 transgalactosylation 반응에서 발생하는 galactose에 의한 product inhibition도 생각할 수 있다[7]. 한편, western blotting 결과를 보면 선행연구에서와 같이 재조합 *E. coli* 안에 발현된 β-gal은 insoluble fraction에서 관찰되었다[6-11]. 이러한 현상은 alginate bead안의 *E. coli* 세포에 발현된 β-gal이 inclusion body로 추정되는 insoluble fraction으로 존재한다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있겠다. 이미 이러한 β-gal의 발현 현상에 대한 관찰과 분석은 본 연구팀의 선행연구에서 언급하였으며, *E. coli*의 *araBAD* 프로모터 시스템에서의 특징적인 현상이라고 할 수 있다[6, 8]. 또한, 이 때 *E. coli* 세포에 발현된 β-gal이 효소로서의 활성을 잘 유지하고 있기 때문에 CPN에서 CPN-Gal로의 전환반응이 잘 진행되었다고 할 수 있다.

CPN에서 CPN-Gal로의 전환수율이 감소 원인으로 생각할 수 있는 것 중에서 bead로부터 *E. coli* 세포 자체의 유출을 생각할 수 있다. 그래서, 일곱 번의 반복적인 회분반응을 실시 한 후, 336시간 이후의 bead 상태를 사진으로 관찰하여 보았다 (Fig. 4). 반복 회분반응 실험 시작 전 *E. coli*를 고정화시킨 alginate bead와 비교하여 볼 때, 일곱 번의 반응이 끝난 alginate bead의 표면에서는 많은 균열이 발견되었다. 이러한 균열이 192시간 이후의 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환수율 감소의 한가지 주된 원인이 될 수 있을 것으로 추론되어진다. Fig. 3과 4의 결과로 보아 192시간 이후의 전환수율 감소의 원인으로 위에서 언급한 여러가지 요소들을 생각할 수 있을 것으로 보

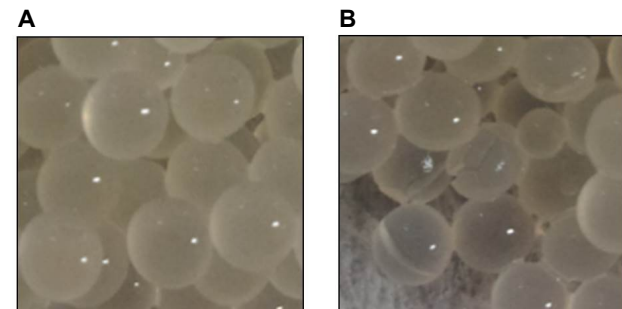


Fig. 4. Photographs of alginate beads, which were collected (A) at time zero of operation, and (B) 336 hr, when the operation was finished. The photograph was pictured by a pocket digital camera.

여진다. 즉, *E. coil* 세포 안의 β -gal의 불활성화, galactose에 의한 inhibition, 그리고 alginate bead의 균열에 의한 *E. coil* 세포의 유출 등이 복합적으로 작용한 것으로 생각된다. 본 연구팀에서는 현재 위 요소 중에서 alginate bead의 균열을 방지하기 위하여 alginate bead를 보강하는 연구를 진행 중에 있다. 그 중에서 chitosan을 이용한 bead의 coating [1]과, gelatin을 bead 제조할 때, 첨가하는 방법[4]에 대하여 연구 중에 있다.

본 연구를 통하여, 보다 안전한 화장품용 살균/방부제를 생산하기 위하여 β -gal을 생산하는 *E. coil*를 alginate bead에 고정화된 시켜서 CPN으로부터 CPN-Gal을 생산하려는 시도를 수행하였으며, 적어도 평균 전환수율 64.9%로 192시간 동안 4회에 걸친 반복 회분반응을 수행 할 수 있었다. 192시간 이후에 전환수율 감소가 관찰되었지만, 이러한 연구결과는 앞으로 상업적인 생산의 가능성을 확인시켜주는 결과로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2015년 한국교통대학교 지원을 받아 수행하였습니다. 그리고 본 연구에 참여한 이상은과 연주혜 학생에게 감사함을 전합니다.

References

1. Abbaszadeh, S., Gandomi, H., Misaghi, A., Bokaei, S. and Noori, N. 2014. The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 2210-2216.
2. Benjamin, G. D. and Robinson, M. A. 2002. Drug delivery systems based on sugar-macromolecule conjugates. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **5**, 279-288.
3. Bridiau, N., Taboubi, S., Marzouki, N., Legoy, M. D. and Maugard, T. 2006. β -Galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnol. Prog.* **22**, 326-330.
4. Fadnavis, N. W., Sheelu, G., Kumar, B. M., Bhalerao, M. U. and Deshpande, A. A. 2003. Gelatin blends with alginate: Gels for lipase immobilization and purification. *Biotechnol. Prog.* **19**, 557-564.
5. Huang, J., Gao, F., Tang, X., Yu, J., Wang, D., Liu, S. and Li, Y. 2010. Liver-targeting doxorubicin-conjugated polymeric prodrug with pH-triggered drug release profile. *Polym. Int.* **59**, 1390-1396.
6. Jung, K. H. 2008. Enhanced enzyme activities of inclusion bodies of recombinant β -galactosidase via the addition of inducer analog after L-arabinose induction in the *araBAD* promoter system of *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 434-442.
7. Jung, K. H. and Lee, H. Y. 2015. *Escherichia coli* β -galactosidase-catalyzed synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside and its characterization. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**, 365-372.
8. Jung, K. H., Yeon, J. H., Moon, S. K. and Choi, J. H. 2008. Methyl α -D-glucopyranoside enhances the enzymatic activity of recombinant β -galactosidase inclusion bodies in the *araBAD* promoter system of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 695-701.
9. Lee, S. E., Jo, T. M., Lee, H. Y., Lee, J. and Jung, K. H. 2013. β -Galactosidase-catalyzed synthesis of galactosyl chlorphenesin and its characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 1299-1312.
10. Lee, H. Y. and Jung, K. H. 2014. Enzymatic synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1254-1259.
11. Lee, S. E., Lee, H. Y. and Jung, K. H. 2013. Production of chlorphenesin galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 826-832.
12. Melisi, D., Curcio, A., Luongo, E., Morelli, E. and Rimoli, M. G. 2011. D-Galactose as a vector for prodrug design. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2288-2298.
13. Scheckermann, C., Wagner, F. and Fischer, L. 1997. Galactosylation of antibiotics using the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 629-634.
14. Tietze, L. F. and Schmuck, K. 2011. Prodrugs for targeted tumor therapies: recent developments in ADEPT, GDEPT and PMT. *Curr. Pharm. Design* **17**, 3527-3547.

초록 : 고정화된 β -galactosidase 생산 대장균을 이용한 chlorphenesin galactoside 생산

정경환*

(한국교통대학교 생명공학과)

화장품용 방부제인 CPN-Gal은 사람 피부세포에 대하여 보다 안전하다고 알려져있다. 장기간에 걸쳐서 CPN-Gal을 생산하는 공정을 확립하기 위하여, β -gal을 생산하는 재조합 대장균을 alginate bead에 고정화 시켜서, 반복 회분식 반응으로 CPN으로부터 CPN-Gal로의 전환반응(transgalactosylation)을 조사하여 보았다. 이 전환반응은 300 ml flask에서 수행하였으며, 반응액에는 고정화된 대장균, 33.8 mM CPN, 400 g/l lactose가 포함되어있으며, pH와 온도는 7.0과 40°C 였다. 이 때, galactose 한 분자가 lactose로부터 CPN으로 전달된다. 반복 회분식 전환반응은 4회 연속적으로 192시간 동안 성공적으로 수행이 가능하였고, 이 때, 64%의 전환수율을 보였으며, 이 결과는 선행연구 결과에 비하여 보다 우수한 결과이다. 그런데, 반복 회분식 반응이 진행되면서, 192시간 이후부터는 점진적으로 전환수율의 감소가 관찰되었다. western blotting으로 β -gal의 양을 관찰하여본 결과, β -gal의 양의 감소가 관찰되었으며, alginate beads에서 깨어진 금이 또한 발견되었다. 이러한 bead의 깨어짐 현상과 아울러서 β -gal의 불활성화, 그리고 galactose에 의한 product inhibition 등이 192시간 이후의 전환수율 감소의 원인으로 생각된다. 본 연구의 전환공정은 β -gal의 정제가 필요 없이 진행할 수 있기 때문에, CPN-Gal 합성이 보다 실용적이고, 가격 경쟁력 있게 수행될 수 있을 것으로 생각된다. 그래서, 이러한 전환공정이 CPN-Gal을 상업화하기 위한 공정으로 발전하길 기대하고 있다.