

## Lipase를 생산하는 재조합 *E. coli*의 phage에 의한 용균

문유희, 구윤모  
인하대학교 생물공학과

### Controlled Lysis of Lipase-Producing Recombinant *E. coli*

Yun-Hee Moon, Yoon-Mo Koo

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

#### 서론

재조합 제품들의 생산을 위한 host-vector로서 *E. coli*는 산물을 세포안에 축적하므로 세포 파괴를 위하여 phage lysogen system( P90c/φ434/pTTY2 )을 이용하였다. 플라스미드 pTTY2를 IPTG유도에 의하여 리파제를 생산한 후 적절한 시기에 UV조사나 mitomycin C를 첨가하여, P90c의 chromosome상에 있는 파지 434가 lytic cycle을 거치도록 유도함으로써 숙주세포를 용해시켰다.

플라스미드 pTTY2를 lysogen P90/φ434에 삽입하여 재조합 P90c/φ434/pTTY2를 합성하였고, 이 재조합균주에 대하여 IPTG 유도시점, 기간등의 최적용해조건을 구하였다.

#### 이론

P90c/φ434/pTTY2는 P90c의 chromosome상에 파지 434를 integration시킨 다음 리파제를 생산하는 pTTY2를 transformation시켜 얻는다[1]. 이 phage lysogen system에 의한 세포파괴 방법은 공정이 단순하고 경제적 부담이 적은 장점이 있다.

UV조사나 mitomycin C의 첨가는 P90c/φ434/pTTY2의 DNA를 손상시키고 이로 인해 RecA protein양이 증가하게 된다[2-4]. 증가된 RecA protein은 chromosome상에 있는 파지 유전자를 세포질내로 유도함과 동시에 파지 유전자에 결합되어 있는 repressor를 제거함으로써 파지가 생성되고 90분이 경과되었을때 숙주를 용해시킨다[2-4].

플라스미드 pTTY2는 크기가 6.1kb인 pUC19유도체로서 copy number가 월등히 높고 유전자 배열상에 tac promotor, ampicillin resistance gene, rmb transcription, 그리고 lacI<sup>q</sup>가 있다[6].

pTTY2상의 리파제 유전자는 *Pseudomonas fluorescens*로부터 유래되었으며 호알칼리성 및 내열성의 성질을 띠어 최적온도는 40 ~ 45℃이고 최적 pH는 8.0 ~ 9.0이다[6].

#### 실험

Single lysogen( P90c/φ434 )의 합성, 재조합 대장균 BL21/pTTY2로부터 pTTY2를 분리하기 위한 Alkaline lysis 방법, P90c/φ434를 competent cell로 만들고 pTTY2를 transformation시켜 재조합 대장균( P90c/φ434/pTTY2 )을 합성하는 방법,

transformation의 여부를 확인하기 위해 0.7 % agarose gel에서 전기영동하는 방법은 Molecular cloning을 참조하였다[1].

Mitomycin C첨가나 UV조사는 25ml LB배지에 P90c/φ434/pTTY2를 접종하여 37 °C, 200 ~ 250 rpm으로 키운 후 IPTG를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 대하여 다양한 미생물 농도를 가질 때 행하였으며 미생물 농도는 spectrophotometer( 600nm )를 이용하여 측정하였다. Mitomycin C의 첨가량은 5 μg/ml 이고 UV조사 방법은 UV lamp( 800 μJ/cm<sup>2</sup>, 90 sec )를 미생물 배양액으로부터 1cm의 거리를 유지하도록 하였으며 incubator의 회전속도를 250 ~ 300 rpm으로 맞춘 다음 조사하였다.

### 결과 및 토론

P90c/φ434/pTTY2를 합성한 후 P90c/φ434와 P90c/φ434/pTTY2를 전기영동한 결과 P90c/φ434는 플라스미드 band를 보이지 않았고 P90c/φ434/pTTY2는 플라스미드 band를 보였다.

P90c/φ434/pTTY2로부터 리파제의 생성유무는 LAT plate와 Rhodamine B plate에서 형성되는 halo로써 확인하였다. 이는 에스터라제가 LAT plate내에 있는 tributyrin, 리파제가 Rhodamine B plate내에 있는 olive oil을 각각 분해함으로써 생기는 현상으로 LAT plate의 halo는 육안으로 보여지고 Rhodamine B plate의 halo는 UV detector위에서 보여진다[5].

pTTY2는 *tac* promotor를 가지고 있어서 IPTG로 induction할 경우 많은 양의 inclusion bodies를 형성하며 이는 SDS-PAGE에 의해 확인될 수 있다.

다양한 미생물 농도에서 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 1시간, 2시간, 3 ~ 4시간이 경과되었을 때 UV조사와 mitomycin C를 첨가하여 보았는데 1시간이 경과되었을 때 용해경향을 확실히 보였고 시간이 경과될수록 용해경향이 감소됨을 알았다. 또한 같은 조건의 실험에서 mitomycin C의 첨가가 UV조사보다 미생물을 더 효과적으로 용해시킨다는 것을 알 수 있었으나 발암물질인 mitomycin C를 첨가하는 경우는 바람직하지 못하다.

이를 극복하기 위한 방법으로 임의로 UV조사 시간을 증가시키거나 mitomycin C의 첨가량을 증가시켜 보았는데 지나친 UV조사나 mitomycin C의 양은 미생물을 죽게 하는 것으로 밝혀졌다.

### 참고문헌

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.: " Molecular cloning ", 2nd ed, 3(1), Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).
2. Ptashne, M.: " A Genetic Switch Gene Control and Phage λ ", Cell Press & Blackwell Scientific Publications (1986-1987).
3. Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Stahl, F.W. and Weisberg, R.A.:" LAMBDA II ", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1983).
4. Park, S.S. and Koo, Y.M.: *Biotech. Letters*, 16(10), 1007-1010(1994).
5. Kouker, G. and Jaeger, K.E.: *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 53(1), 211 ~ 213(1987).
6. Chung, G.H.: Ph. D. Thesis," Cloning and Overexpression of a Thermostable Lipase Gene form *Pseudomonas fluorescens* in *E. coli* ", (1990).

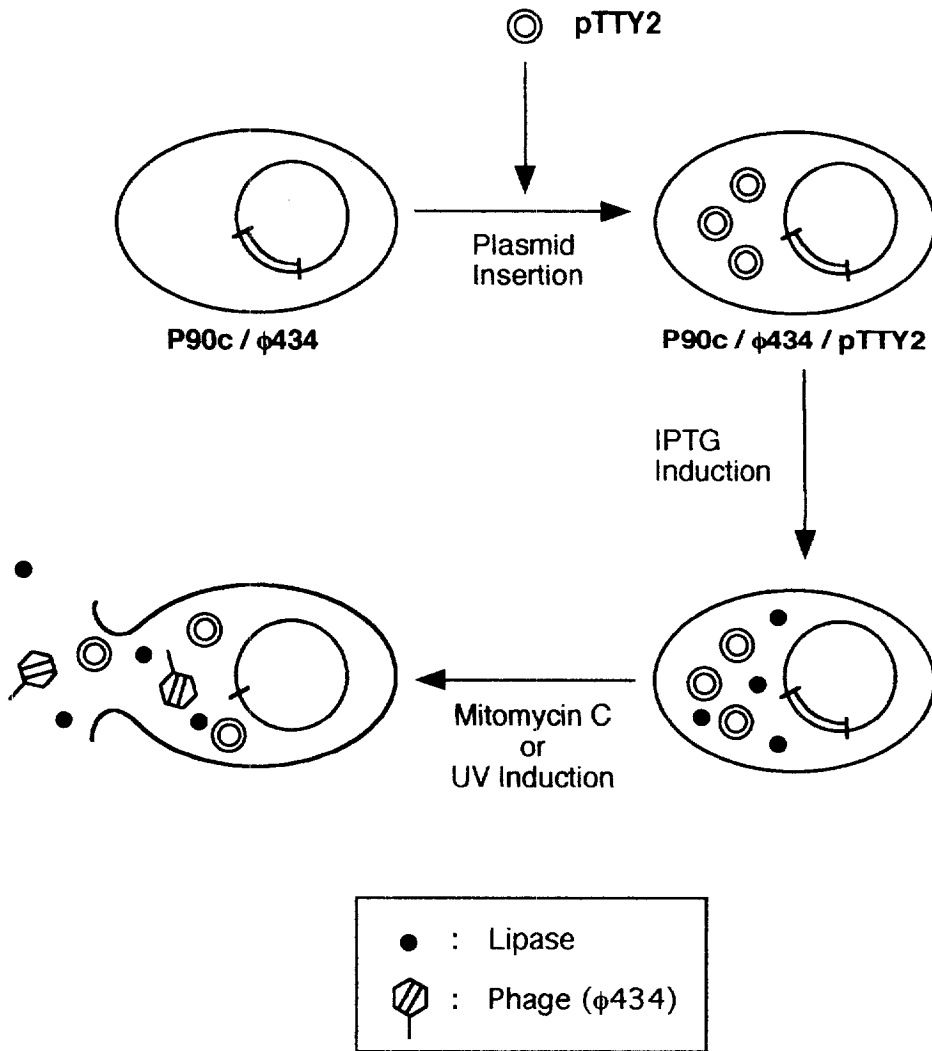


Fig. 1. Schematic representation of the synthesis of the recombinant single lysogen and the sequential enzyme production and the cell lysis.

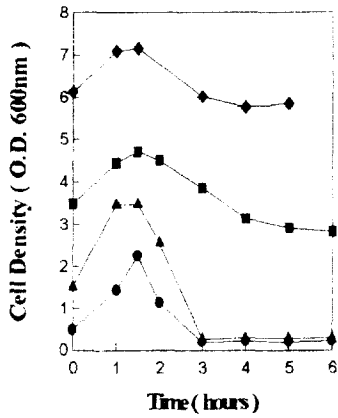


Fig. 2. Lysis of P90c/φ434/pTTY2 by the mitomycin C addition at various cell densities.

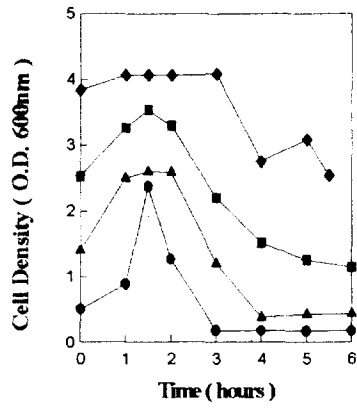


Fig. 3. Lysis of P90c/φ434/pTTY2 by the UV irradiation at time zero for various cell densities.

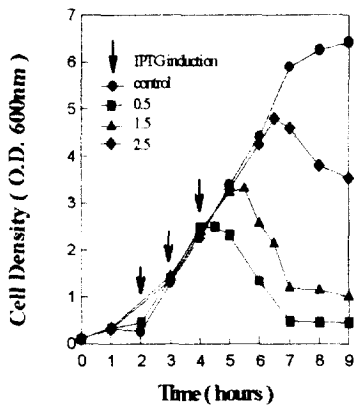


Fig. 4. Lysis of P90c/φ434/pTTY2 by the mitomycin C at one hour after IPTG induction for various cell densities.

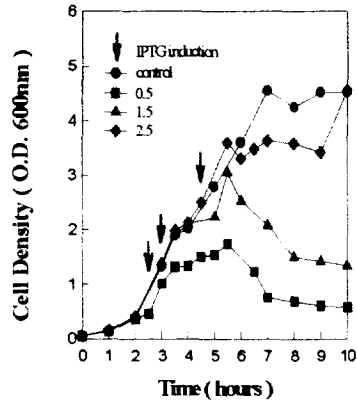


Fig. 5. Lysis of P90c/φ434/pTTY2 by the UV irradiation at one hour after IPTG induction for various cell densities.