

박테리오파아지를 벡터로 이용한 생산성이 높고 안정적인 재조합 대장균의 연속 배양

오정석, 박태현
서울대학교 응용화학부

Stable and Highly Productive Continuous Operation of Recombinant *Escherichia coli* Using Bacteriophage λ Q⁻ Vector

Jeong Seok Oh, Tai Hyun Park

School of Chemical Engineering, Seoul National University,
Kwanak-Gu Shilim-Dong San 56-1, Seoul 151-742, Korea

서론

유전자 재조합 기술의 발달에 의해 많은 종류의 재조합 단백질이 산업적 규모로 생산되고 있다. 특히 대장균은 생물학적 특성이 잘 알려진 미생물로서 가장 먼저 재조합 단백질의 산업적 생산에 널리 사용되어져 왔다. 그러나 연속 배양의 경우에는 플라스미드 불안정성이 커다란 문제로 작용하였다. 이를 극복하기 위해서 많은 연구가 수행되었지만, 특히 2단계 연속 배양 방법에 대한 연구가 진행되었다^{1,2}. 첫 번째 발효조는 외부 유전자 발현이 억제된 상태에서 플라스미드 안정성이 더 높다는 점을 이용한 성장 단계이고, 둘째 발효조는 첫째 발효조에 배양된 세포를 넘겨받아 연속적으로 재조합 단백질을 생산하는 단계이다. 이와 같은 2단계 연속 배양에서 안정성을 더 높이기 위해서 박테리오파아지 람다의 이용에 관한 연구가 수행되었다^{2,3}. 람다 DNA는 숙주 세포의 염색체 DNA에 삽입되어 염색체 DNA와 함께 복제되는 lysogenic 상태와, 자기 유전자를 약 100배정도 복제하는 lytic 상태로 나누어진다⁴. 2단계 연속 배양에서 첫 번째 단계인 세포 성장 단계에서는 외래 유전자를 가진 세포를 안정적으로 배양하기 위해 lysogenic 상태를 유지시키고, 둘째 단계인 생산 단계에서는 첫 번째 단계로부터 공급된 세포의 재조합 유전자수를 증대하여 생산성을 높이기 위해 lytic 상태를 유지한다. lysogenic 상태에서 lytic 상태로의 유도는 온도에 민감한 돌연변이를 사용하여 단지 온도 증가만으로 유도할 수 있다. 그러나 박테리오파아지 람다는 어느 정도 복제하다가 packaging이 일어나게 되고, 숙주 세포를 죽이기 때문에 재조합 단백질 생산을 위한 충분한 시간이 제공되지 못하는 문제점이 있다^{2,5}. 이를 해결하기 위하여 cell lysis나 packaging을 조절하는 anti-terminator Q를 amber mutation시킨 박테리오파아지 람다가 제작되었고³, 온도 민감한 돌연변이에 대한 최적 온도 연구도 수행되었다⁵. 본 연구에서는 Q⁻ λ DNA를 벡터로 이용하여 재조합 대장균 연속 배양에서의 불안정성 문제를 극복하였고, 생산단계에서 재조합 단백질 대량생산을 위한 조업방법의 최적화를 수행하였다.

실험 방법

Escherichia coli P90c (ara Δ (lac-pro) thi)와 박테리오파아지 λ HLL1 (λ lac5 *cIts*857 Qam73)이 숙주세포와 발현 벡터로 사용되었다. P90c는 *lac* I를 포함하고 있지 않기 때문에 inducer로 IPTG를 사용하지 않았다. 종균배양을 위해서는 LB 배지가 사용되었고, 2 g/L glucose와 5 g/L yeast extract가 포함된 M9 배지가 회분 배양과 연속 배양에 사용

되었다. 25 mL LB 배지에서 33°C, 250 rpm에서 12시간 배양한 후 500 mL 배지가 들어 있는 1 L jar fermenter에 접종하여 연속배양을 수행하였다. 첫 번째 발효조는 33°C, 600 rpm에서 lysogenic 상태를 유지시켜 주었고, 두 번째 발효조는 첫 번째 발효조가 정상 상태가 된 후 조업을 시작하였고, 40°C, 600 rpm에서 lytic 상태를 유지시키면서 재조합 단백질을 생산하였다(Fig. 1). β -galactosidase 활성 측정은 Miller 방법에 의해서 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 토론

P90c/ λ HL1에서 생산되는 재조합 단백질이 완전히 유도되는데 걸리는 시간을 결정하기 위해서 회분 배양을 수행하였다. Fig. 2에서 보듯이 유도 후 세포내 β -galactosidase 농도는 2~3 시간 사이에 최대값을 나타내고, 세포 용혈에 의해서 세포내 β -galactosidase가 배지 내로 분비되면서 세포외 β -galactosidase 농도가 증가한다. 총 β -galactosidase 농도는 유도 후 4 h에 최대값을 나타내고 있다. 따라서 Q^- 돌연변이 과야지를 벡터로 사용한 시스템에서 완전히 유도되는데 걸리는 시간은 4 h임을 알 수 있다. 이것은 연속 배양에서 4 h의 평균 체류 시간을 가지도록 dilution rate를 조절하는 것이 바람직함을 의미한다.

박테리오파지 람다는 숙주세포의 영양 상태에 따라서 lytic pathway로 갈 것인지 lysogenic pathway로 갈 것인지를 결정하게 된다. 이것은 람다가 자기 복제를 위해서 숙주세포의 성장 요소들을 사용하기 때문이다. 비록 온도 민감성 돌연변이 gene을 사용하여 강제적으로 유도한다고 하여도 영양분이 고갈된 배지에서는 정상적인 복제가 되지 않을 것이다. 따라서 생산 단계에서 새로운 영양분의 공급은 발현량 증대에 중요한 요소가 된다. Fig. 3은 β -galactosidase 생산에 대한 두 번째 발효조로 공급되는 새로운 배지의 농도 (S_3)의 영향을 보여준다. 그림에서 보듯이 최적 영양분 공급 농도가 존재하고 있다. 첫 번째 발효조에 공급하는 배지인 2 g/L glucose와 5 g/L yeast extract가 포함된 M9 배지 농도를 기준으로 하여, 모든 성분을 공히 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.7배로 변화시키며 실험하였다. 최적공급농도는 첫 번째 발효기에 공급되는 농도의 1.5배이다. 더 높은 농도 이상의 영양분 공급은 β -galactosidase 발현에 억제 효과를 나타내고 있다. 이것은 과도한 glucose 공급이 *lac* promoter에 억제 효과를 나타낸 것으로 생각된다. 세포내 β -galactosidase 농도는 급속도로 감소하는 반면 세포외 농도는 오히려 증가 하다가 다소 감소하는 것을 보인다. 이것은 late gene transcription 활성화에도 영향을 주는 것으로 추정된다.

Fig. 4은 공급되는 영양분의 농도를 dilution rate에 관계없이 배지성분이 일정한 값으로 공급되도록 F_3S_3 를 일정하게 유지시키면서 실험하였다. 즉 dilution rate에 따라서 S_3 를 변화시켰다. 총 β -galactosidase 농도는 dilution rate 증가에 따라 감소하는 경향을 보인다. 그러나 단위 세포당 발현량과 생산성을 보면 $D_2 = 0.25 \text{ h}^{-1}$ 에서 가장 높은 값을 나타낸다. 이것은 $D_2 = 0.152, 0.188 \text{ h}^{-1}$ 에서는 발현량이 증가 했다가 보다는 washout 요소의 감소로 인한 세포 농도 증가가 원인임을 나타낸다. 이 범위에서의 단위 세포당 발현량 감소는 β -galactosidase 활성의 감소나 segregational instability에 의해서 생긴, 람다 벡터가 들어 있지 않은 세포들이 증가한 것으로 생각된다. $D_2 = 0.25$ 보다 높은 dilution rate에서는 충분하지 못한 mean residence time에 의해서 발현량이 감소하였다.

Fig. 5는 두 번째 발효조에 공급되는 농도(S_3)를 일정하게 두고 dilution rate를 변화시켰다. 즉, 낮은 dilution rate에서는 적은 농도의 영양분이 공급되고, dilution rate이 증가할수록 더 많은 영양분이 공급된다. 생산성은 $D_2 = 0.25 \text{ h}^{-1}$ 일 때 최대값을 나타낸다. Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5에서 보듯이 P90c/ λ HL1의 최적 조건은 4 h의 평균 체류시간을 가지고, S_3 농도를 첫 번째 발효조에 공급되는 농도의 1.5배 농도로 공급했을 때이다. Fig. 6는 최

적 조건에서 어느 정도 안정성을 유지하는지에 관한 실험이다. 첫 번째 발효조의 lysogenic 상태는 260 h 이상 안정한 상태를 유지하고 있다. 반면 두 번째 발효조의 lytic 상태는 40 h 정도 유지하다가 세포 용혈이 일어나 감소하고, 다시 자라는 경향을 보인다. 두 번째 발효조의 총 β -galactosidase concentration은 세포 용혈이 일어난 후 낮은 농도의 발현량을 보이고, 100 h 이후 세포가 다시 성장하여도 더 이상의 증가는 없었다. 이때 다시 자라는 현상은 segregational instability에 의해서 생긴 세포들이 성장한 것으로 생각된다. 최적 조건에서 재조합 단백질의 생산성은 single copy로 들어 있는 lysogenic 상태에 비해 약 370배 정도의 발현증가를 보였다.

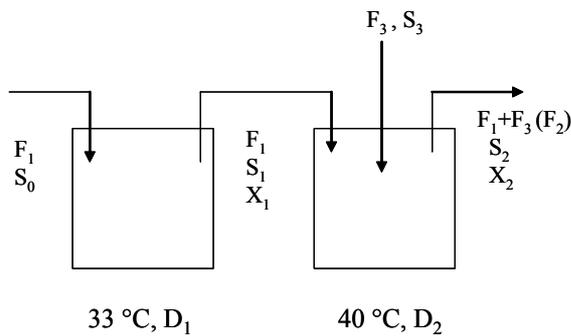


Fig. 1 Schematic diagram of two-stage continuous culture.

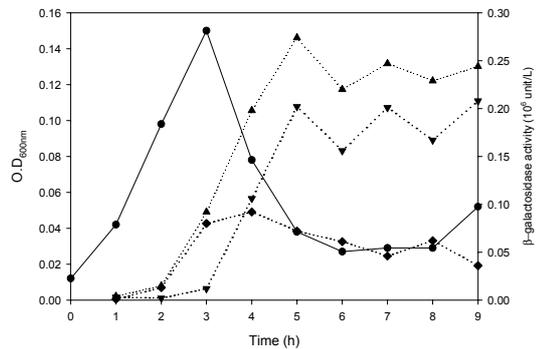


Fig. 2 Batch culture: (●) cell concentration, (\blacktriangle) total β -galactosidase concentration, (\blacklozenge) intracellular β -galactosidase concentration, (\blacktriangledown) extracellular β -galactosidase concentration

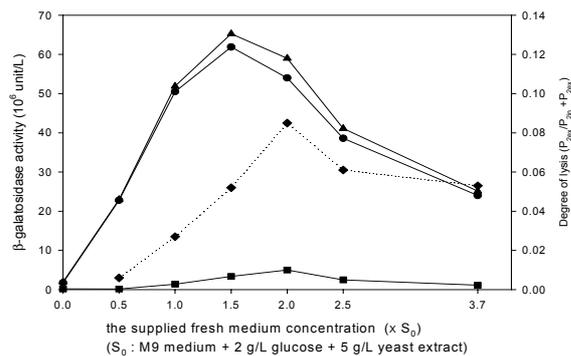


Fig. 3 Effect of fresh medium concentration (S_3). D_2 was maintained at a constant level ($D_2=0.25$). (●) intracellular β -galactosidase concentration (P_{2in}), (\blacksquare) extracellular β -galactosidase concentration (P_{2ex}), (\blacktriangle) total β -galactosidase concentration, (\blacklozenge) Degree of lysis

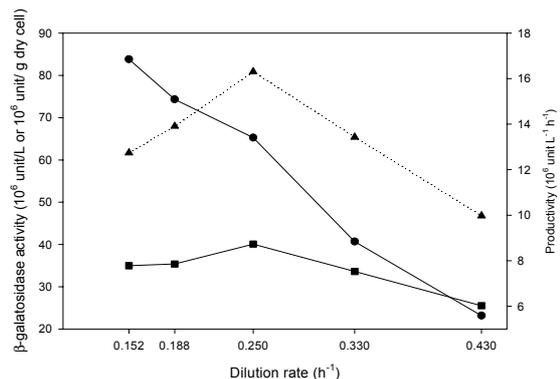


Fig. 4 Effect of mean residence time. The amount of medium components was maintained at a constant level ($F_3S_3=const$). (●) total β -galactosidase concentration, (\blacksquare) specific total β -galactosidase concentration, (\blacktriangle) productivity.

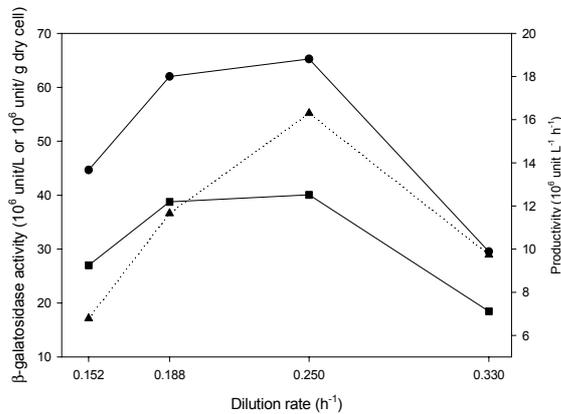


Fig. 5 Effect of mean residence time. Fresh medium concentration was fixed ($S_3 = \text{const.}$).
 (●) total β -galactosidase concentration, (■) specific total β -galactosidase concentration, (▲) productivity.

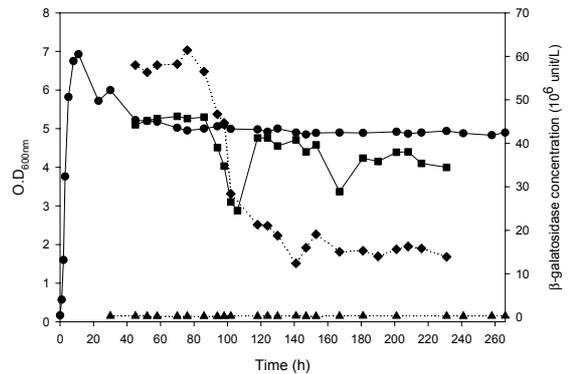


Fig. 6 Stability of the cloned gene expression in two stage continuous culture : (●) cell concentration in first tank, (■) cell concentration in second tank, (▲) total β -galactosidase concentration in first tank, (◆) total β -galactosidase concentration in second tank

참고 문헌

1. Park, S. H., Ryu, D. D. Y. 1990. Effect of operating parameters on specific production rate of a cloned-gene production and performance of recombinant fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 287-295.
2. Park, T. H., Seo, J. H., Lim, H. C. 1991. Two-stage fermentation with bacteriophage λ as an expression vector in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 297-302.
3. Lin, C. S., Chen, B. Y., Park, T. H., Lim, H. C. 1998. Characterization of bacteriophage λ Q^{-1} mutant for stable and efficient production of recombinant protein in *Escherichia coli* system. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 529-535.
4. Padukone, N., Peretti, S. W., Ollis, D. F. 1990. λ vectors for stable cloned gene expression. *Biotechnol. Prog.* **6**: 277-282.
5. Kim, T. S., Park, T. H. 2000. Optimization of bacteriophage λ Q^{-1} -contatin recombinant *Escherichia coli* fermentation process. *Bioprocess Eng.* **23**: 187-190