

합성 배지를 이용한 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*
유가배양에서 인체 Lipocortin-I의 분비생산

조태연, 홍억기, * 정봉현

강원대학교 발효공학과, * 생명공학연구소

Secretory Production of Human Lipocortin-I in Fed-Batch Culture of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Using a Synthetic Medium

T.Y. Cho, E.K. Hong, * B.H. Chung.

Department of Fermentation engineering, Kangwon National University

* Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

서론

인체 Lipocortin-I은 스테로이드 유도성 단백질로 인지질(phospholipid)의 대사에 관여하는 효소인 포스포리파제 A₂(phospholipase A₂)의 활성을 저해하며 항염증성 효과를 나타낸다. 또한 이것은 calcium 의존성 인지질 결합 단백질로 부작용이 거의 없으므로 새로운 항염증 치료제로 개발 가능성이 높다. 재조합 단백질 생산과정에서 정제 과정이 차지하는 비중이 상당히 크므로 이과정을 단순화 하기위해 여러가지 방법들이 모색되고 있다 (1). 본연구에서도 이러한 목적을 가지고 일반적으로 사용되는 혼합배지가 아닌 합성배지를 사용하여 재조합 LC1 발효공정의 개발을 통해 정제과정의 단순화 가능성과 발현된 LC1 변화 양상을 연구하였다.

재료 및 방법

사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* 2805(Mat a pep4::HIS3 pro1- δ can1 GAL2 his3 δ ura3-52)로 uracil 요구성이며 단백질 분해효소 결손변이주이다. 플라스미드 YEG α -LC은 GAL promoter 하류에 분비신호 pre-pro leader(PPL) 와 인체 lipocortin-1 유전자를 가지고 있다(2).

합성배지는 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하였고 공급배지에 부족되는 무기염류, 미량원소, 비타민을 첨가하였다(3). 유가배양시 공급배지의 탄소원농도는 200 g/L였으며, 대수증식기까지는 포도당으로만 배지를 공급했고 그 이후 LC1발현시기에는 포도당과 갈락토오스 비율 1:1을 사용하였다.

결과 및 고찰

최소배지를 사용하여 유가식 배양을 한 결과는 Fig. 1에 나타나있다. 균체량이 약 10 g/L에 도달했을때(52hr) 포도당과 갈락토오스가 1:1을 포함하고 있는 배지를 공급했다. 포도당의 완전한 고갈을 유도해서 갈락토오스를 세포가 이용할 수 있는 조건을 만들기 위해 배지공급속도를 줄인후 6hr 후에 다시 높여 주었다. 그로인해 탄소원과 질소원의 고갈로 균체량이 감소했다. 이것은 부족된 영양으로 인한 세포의 lysis 때문으로 생각된다. 결과적으로 배양시간은 140시간 이었고, μ 값은 0.04 hr^{-1} , 균체량은 17 g/L였다. 총단백질량은 0.4 g/L였고 그 중 LC1은 0.18 g/L였다. 플라스미드 안정성은 95 % 이상의 높은 안정성을 보였다.

Fig. 2의 SDS-PAGE 결과를 살펴보면 배지로 분비된 단백질의 양이 많지 않아 band가 다소 깨끗하였다. 따라서 분리정제 공정이 간단해지므로 생산 경비를 줄일 수 있을 것으로 판단된다. Densitometer를 이용한 gel scanning 결과 총단백질에 대한 LC1의 비율은 47%였다.

Immunoblotting을 한결과 4개의 band가 나타났는데, 이것은 발현된 LC1이 일부 protease에 의해 분해되었기 때문으로 보이며, post-translational modification에 의해 당쇄부가된 LC1도 일부 존재할 것으로 추측된다.

합성배지에서 배지로 분비된 단백질이 혼합배지보다는 정제하기 용이하다는 장점을 지니지만 혼합배지에서 보다는 생산성이 떨어지는 문제점을 보여 주었다. 또한 LC1 발현 유도 배지의 갈락토오스와 포도당의 비율을 1:1로 했을때 질소원과 탄소원의 부족으로 혼합배지와는 다르게 균체량이 감소하는 문제점도 확인 되었다. 따라서 합성배지의 공급 속도 그리고 갈락토오스와 포도당의 비율을 달리하는 재조합 LC1 발효공정의 최적화 연구를 집중적으로 수행 하였다.

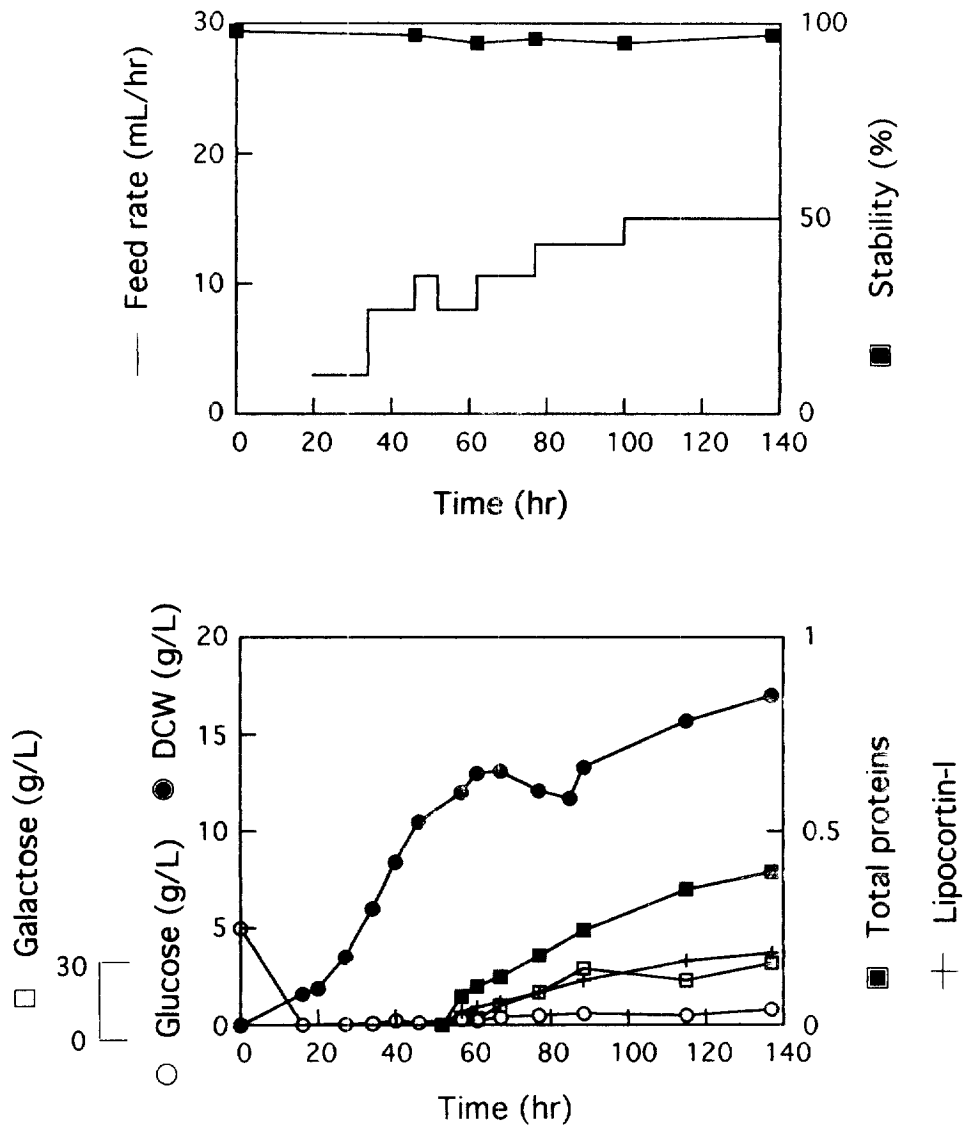


Fig. 1 Time profile of fed-batch culture with 2805/pYGLP-10

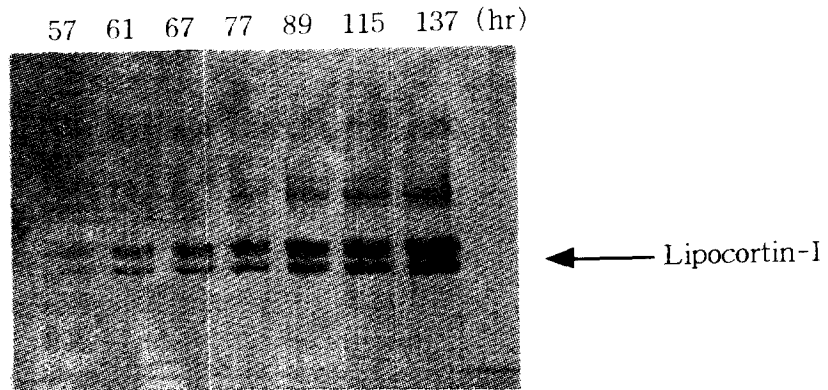


Fig. 2 SDS-PAGE analysis

참고문헌

1. 한국과학기술원 유전공학연구소 보고서. 항염증성 재조합 리포코르틴 생산 및 분리정제 기술 개발. (1995)
2. B. M. Kim, B. H. Chung, S. K. Ree, Y. H. Park and S. W. Nam., Production and purification of human lipocortin-I secreted by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 10(3):343-348 (1995)
3. J. C. Fieschko, K. M. Egan, T. Ritch, R. A. Koski, M. Jones and G. A. Bitter, Controlled expression and purification of human immune interferon from high-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 29:1113-1121 (1987)