

## 재조합 효모를 이용한 항혈전 단백질 히루딘 발효 생산공정의 최적화

김명동, 강현아<sup>1</sup>, 이상기<sup>1</sup>, 서진호<sup>\*</sup>

서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재 연구센터, 한국생명공학연구원<sup>1</sup>

전화 (031) 290-2591, FAX (031) 293-4789

### Abstract

Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains harboring various copy numbers of hirudin gene were developed to study dependency of hirudin expression level on its gene copy number. A linear relationship between the copy number of hirudin expression cassette and hirudin expression level was observed up to 10 copies. A double  $\delta$ -integration vector truncated with the unnecessary bacterial genes before yeast transformation showed a four-fold increase in transformation efficiency and a 1.3-fold enhancement in hirudin expression level compared with a single  $\delta$  system. Gratuitous hirudin expression strain was developed by disrupting the *GALI* gene of *S. cerevisiae*. Glucose that was fed in a limited manner effectively supported cell growth and hirudin expression by the gratuitous strain. Effects of methanol concentrations on hirudin production in recombinant *Hansenula polymorpha* were investigated in continuous and fed-batch cultures. At a steady-state of continuous culture, an optimum methanol concentration of 1.7 g/L was determined at a dilution rate of 0.18 h<sup>-1</sup> with 1.8 mg/L · h hirudin productivity.

### 서론

본 연구에서는 히루딘을 생산할 수 있는 재조합 *S. cerevisiae*에서 히루딘 유전자의 copy number와 히루딘 발현효율과의 관계를 조사하여, 10 copy number까지 히루딘 유전자의 copy number와 발현효율간에 선형적인 관계가 있음을 규명하였다. 히루딘 유전자가 염색체로 도입된 재조합 효모는 기존의 플라스미드에 기반한 재조합 효모에 비하여 약 2배 이상의 히루딘 생산성을 나타내었으며, 염색체로 도입된 히루딘 유전자는 비선택적인 배지에서도 장시간 안정적으로 유지됨을 알 수 있었다. *S. cerevisiae*의  $\delta$ 서열부위를 이중으로 도입한 히루딘 발현벡터를 제조하여 히루딘 유전자의 숙주 효모세포로의 형질전환 효율을 4배 이상 증가시킬 수 있었으며, 염색체로 도입되는 히루딘 발현유전자의 copy number를 최대 50% 증가시킬 수 있었다. 히루딘을 생산하는 재조합 *S. cerevisiae*에서 균체의 성장과 히루딘 발현을 유도하기 위해서 사용하는 고가의 기질인 갈락토스의 소비를 방지하기 위하여 *S.*

*cerevisiae*의 *GAL1* 유전자를 과쇄한 균주를 개발하였다. 갈락토스를 이용하지 못하는 재조합 효모의 유가식 배양공정에서 포도당을 제한적으로 공급함으로써 히루딘 생산성을 최대 49% 증가시킬 수 있었다. 메탄올을 자화할 수 있는 효모인 재조합 *Hansenula polymorpha*를 이용한 회분식, 연속식 및 유가식 공정에서 히루딘 생산을 위한 최적의 메탄올 농도는 약 1.7 g/L 이었으며, 이때의 히루딘 생산성은 1.8 mg/L · h 이었다.

#### 재료 및 방법

*GAL10* promoter에 의하여 조절되는 히루딘 발현 플라스미드인 YEGaHIR525를 함유하는 재조합 *S. cerevisiae* 2805 균주와, 히루딘 발현 유전자를 염색체로 도입할 수 있는 벡터의 형질 전환에는 *S. cerevisiae* 2085 균주를 이용하였다. 히루딘 발현유전자를 효모세포의 염색체로 도입하기 위한 운반용 벡터는 p $\delta$ -neo 및 YIp5를 사용하였다. 히루딘 생산을 위하여 MOX promoter에 의하여 히루딘 발현이 조절되는 pUAEM36 함유하고 있는 *H. polymorpha* DLUV10을 사용하였다. 재조합 *S. cerevisiae* 및 *H. polymorpha* 균주는 pH 5.0, 30°C에서 배양하였다.

#### 결과 및 고찰

*GAL10* promoter, 히루딘 구조 유전자 및 *GAL7* terminator로 구성된 히루딘 발현유전자를 효모 염색체의  $\delta$  부위에 다중으로 도입할 수 있는 M $\delta$ HIR 벡터와 *URA3* 부위에 single copy로 도입할 수 있는 YIpHIR 벡터를 이용하여 히루딘 유전자의 copy number와 히루딘 발현과의 관계를 규명하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 히루딘 유전자가 약 10 copy 정도까지 히루딘 발현양과 히루딘 유전자 사이에 선형적인 관계가 존재함을 알 수 있었다. 효모염색체로 도입되는 히루딘 유전자의 형질전환 및 copy number를 증가시키기 위하여  $\delta$  서열을 이중으로 사용한 M $\delta$ HIR $\delta$  벡터를 제조하였다. M $\delta$ HIR $\delta$  벡터에 의한 형질전환 효율은 4배 이상 증가하였으며, 효모 염색체로 도입되는 히루딘 유전자의 copy number는 1.5배, 히루딘 발현양은 약 1.5배 증가하였다. 히루딘을 생산하는 재조합 *S. cerevisiae*에서 균체의 성장과 히루딘 발현을 유도하기 위해서 사용하는 고가의 기질인 갈락토스의 소비를 방지하기 위하여 *S. cerevisiae*의 *GAL1* 유전자를 과쇄한 균주를 개발하였다. *GAL1* 유전자가 과쇄된 균주는 갈락토스를 이용하지 못하는 것으로 확인되었으며, 소량의 갈락토스를 이용하여 효과적으로 히루딘을 생산할 수 있었다. 또한 갈락토스를 이용하지 못하는 재조합 효모의 유가식 배양공정에서 포도당을 제한적으로 공급함으로써 히루딘 생산성을 최대 49% 증가시킬 수 있었다. 메탄올을 자화할 수 있는 효모인 재조합 *Hansenula polymorpha*를 이용한 히루딘

생산공정을 해석하고 최적화하였다. 회분식, 연속식 및 유가식 공정을 이용하여 히루딘 생산을 위한 최적의 메탄올 농도를 결정하였다. 재조합 *H. polymorpha*에서의 히루딘 발현을 위한 최적의 메탄올 농도는 약 1.7 g/L 이었으며, 이때의 히루딘 생산성은 1.8 mg/L · h 이었다. 또한 methanol oxidase promoter에 의한 히루딘 발현은 탄소원으로 주입한 포도당 및 글리세롤이 완전히 소모된 이후에 관찰되었으며, 탄소원의 대사로부터 생성된 에탄올은 메탄올에 의하여 유도되는 히루딘 발현을 지연시키는 것으로 판단되었다.

### 요약

본 연구에서는 히루딘을 생산할 수 있는 재조합 *S. cerevisiae*에서 히루딘 유전자의 copy number와 히루딘 발현양과의 관계를 규명하였으며,  $\delta$  서열을 이중으로 사용한 히루딘 발현벡터를 제조하여 히루딘 유전자의 효모염색체로의 도입효율을 증가시켰다. 숙주세포인 효모의 *GALI* 유전자를 파쇄하여 균체에 의한 갈락토스 소모를 방지하여 보다 경제적으로 히루딘을 생산할 수 있는 시스템을 개발하였으며, 재조합 *H. polymorpha*을 이용한 발효공정에서 히루딘 생산을 위한 최적의 메탄올 농도를 결정하였다.

### 참고문헌

1. Kim MD, Rhee SK and Seo JH, Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal  $\delta$ -integration (2001), *J Biotechnol*, 85, 41-48.
2. Kim MD, Yoo YJ, Rhee SK and Seo JH, Enhanced transformation efficiency of anticoagulant hirudin gene in *Saccharomyces cerevisiae* by a double  $\delta$ -sequence (2001), *J Microbiol Biotechnol*, 11, 61-64.
3. Lee FWF and Da Silva NA, (1996), Application of *Ty1* for cloned gene insertion: amplification of a large regulated expression cassette in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44, 620-623.
4. Park JB, Kweon YE, Rhee SK, and Seo JH, Production of hirudin by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a membrane-recycle fermenter (1995), *Biotechnol Lett*, 17, 1031-1036.
5. Rao KJ, Kim CH, Chung BH, Sohn JH, and Rhee SK, (1998), Effect of galactose feeding on the improved production of hirudin in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng*, 19, 385-388.
6. Sohn JH, Lee SK, Choi ES, and Rhee SK, (1991), Gene expression and secretion of the antithrombotic hirudin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol*

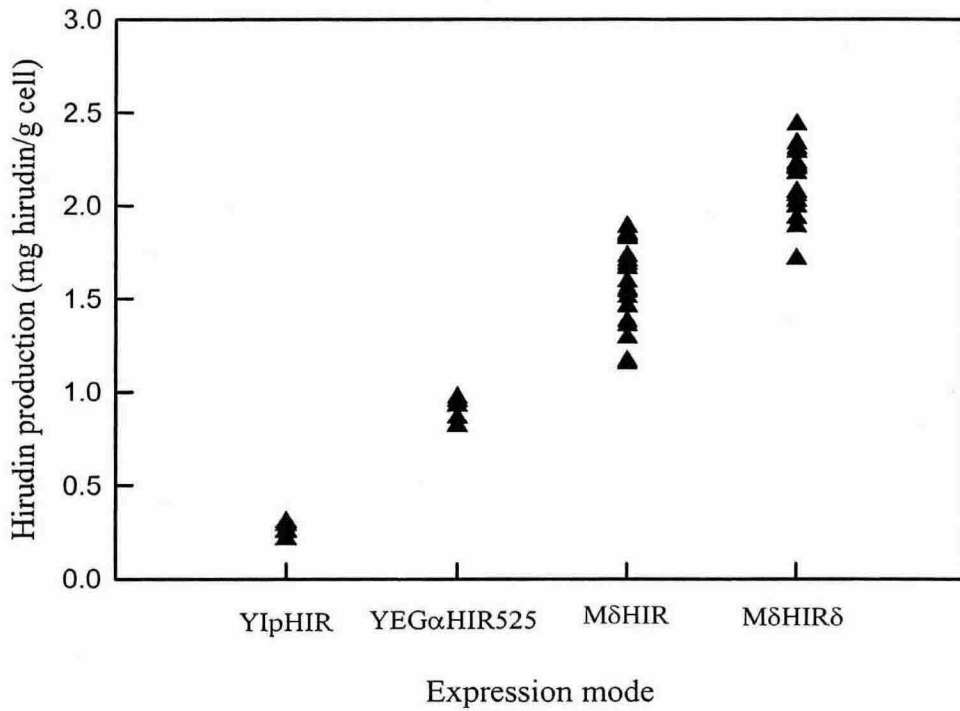


Fig 1. Comparison of specific hirudin expression levels for the four different recombinant *S. cerevisiae* 2805 strains harboring the hirudin gene.