

Yesat 균주를 이용한 비만 억제 제조합 CMP(caseinomacropeptide) 발현 연구

강환구, 윤지선, 박형수, 이충열, 김원철, 박성훈¹
 한남대학교 화학공학과, 에코바이오젠(주)¹
 전화(042)629-8009 팩스(042)623-9489

abstract

CMP(caseinomacropeptide) is known to be a peptide which controls the gain of body weight and eventually will be used as a new candidate to control obesity problem.

In this study, CMP gene was obtained using RT-PCR and ligated to secretion vectors having different kinds of promoters and *P.pastoris* and *S.cerevisiae* were transformed with these vectors. Colonies showing high titre of CMP expressed were chosen and fed-batch fermentation is being carried out with these transformant to test economic feasibility

서 론

사람이나 소 유래의 milk protein 중 일부를 차지하는 casein은 α (S1)-casein, α (S2)-casein, β -casein, κ -casein으로 구성된다. 모든 casein의 두드러진 성질은 pH4.6에서 아주 낮은 용해성을 갖는다는 것이고 일반적인 구성비는 대부분의 casein이 인산염을 가진 형태로 결합한다[3]. 이 중에서 κ -casein은 칼슘 침전에 저항력이 높고 다른 casein을 안정화시키는 장점을 가지고 있으며 이 κ -casein 중 Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ 결합분열시 소수성 부분을 제외하고 남아있는 약 64개의 amino acid로 구성된 친수성(hydrophilic portion)부분이 κ -casein glycomacropeptide 또는 정확히 caseino- macropeptide(CMP)라 일컬어지며 다음과 같은 여러 가지 생리활성을 가진다고 보고되어지며 bovine과 human CMP는 약 76%의 homology를 가진다.

기능성 펩타이드인 CMP는 비만을 억제하는 효능과 항균성 기능을 가지고 있음이 알려져 있고[1,2] 또한 이러한 CMP가 나타내는 생리활성으로는 위에서 gastrin 분비억제 및 cholecystokinin 분비촉진을 통한 식욕조절효과, cholera toxin 및 influenza virus의 저해 작용, oral microbes 부착저해 작용 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 효능에도 불구하고 사람의 모유 중 CMP는 극히 제한된 양이며 bovine에서 유래된 CMP의 경우에도 그 fraction은 매우 제한적이므로 제한된 공급원으로 말미암아 이의 상업화가 어려운 실정이다. 따라서 안전한 효모로 알려진 *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 제조합 CMP발현 균주 개발에 관한 연구를 수행 하였다.

재료 및 방법

유전자 클로닝

Bovine의 경우는 유선세포조직에서 얻은 mRNA를 Bovine CMP(BCMP)의 3'primer를 사용하여 cDNA를 만들었으며(RT-PCR) 이를 template로 PCR에 의해 유전자를 증폭하였다.

5'-AAT GAATTC ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA AAT C-3'

5'-AAT GGTACC TTA GAC CGC GGT TGA AGT AAC-3'

Human의 경우는 nucleotide를 합성하여 template를 만들었다, 이것 역시 PCR에 의해 유전자를 증폭하였다.

5'-AAT GAATTC ATG GCC ATC CCC CCA AAG AAA ATT C-3'

5'-AAT GGTACC TTA TGC CGT AGG TGG AGT AAC-3'

PCR후에 EcoR I 과 Kpn I 으로 절단하여 pichia의 경우 pPICZaA와 pGAPZaA에 cloning하였고, *pichia*와 마찬가지로 *S.cerevisiae*의 경우도 secretion 발현하기 위하여 pYIGP(GAP), PYKANG(GAP), YEGa-HIR525(GAL) vector에 α -factor를 연결후 cloning 하였다.

yeast균주

발현을 위해 *S.cerevisiae* Y2805(his⁻, ura⁻), *P.pastoris* GS115(his⁻) SMD168H(Pep⁻)를 사용하였다. *S.cerevisiae*의 경우 minimal plate에서 amino acid(his⁻, ura⁻)로 selection 하였고, *P.pastoris*는 Zeocin[®]으로 selection하였다.

배양

Minimal media 배양을 통하여 얻어진 균주들의 발현을 위한 기초적인 회분식 실험을 위하여 플라스크 배양을 진행하였다. 플라스크로는 500ml의 baffled flask를 이용하고 100 ml의 배지에 균주를 접종한후 250rpm의 진탕배양기에서 실험하였다. 플라스크 배양을 통하여 고발현 균주를 선택하였고 이 균주를 이용한 최적의 발효방법 개발을 위하여 5L scale의 발효기 (코마이오택(주))를 이용하여 발효실험을 진행하였다. 최적의 발효를 위하여 fermenter batch 방식에 의한 발효로 진행하였다.

결과 및 고찰

*P.pastoris*의 경우 Zeocin plate에서 CMP 유전자를 포함하고 있는 다양한 콜로니를 선택 하였고 플라스크 배양을 통해 발현율이 높은 콜로니를 선택하여 그림 1과 같이 batch 결과 O.D.₆₃₀ 7 에서 발현된 CMP 의 양은 약 30 mg/L이었다.

*S. cerevisiae*는 그림 2와 같이 batch 결과 O.D.₆₃₀ 7 에서 발현된 CMP 의 양은 약 60 mg/L이었다. 현재 fed-batch실험이 진행중이며 preliminary결과 O.D 250에서 약 2 g/L의

제조함 CMP 발현이 기대된다.

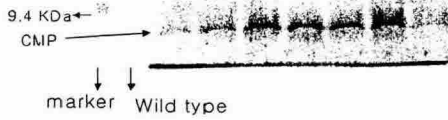


그림. 1

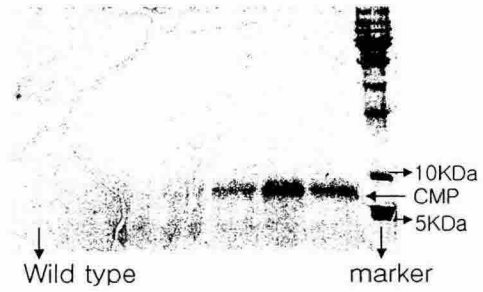


그림. 2

참고문헌

1. Food & Nutrition Science - Detection of the Cholera Toxin-binding Activity of κ -Casein Macropeptide and Optimization of Its Production by the Response Surface Methodology. Oh, S; Worobo, R W; Kim, B; Rheem, S; Kim, S
- 2 Release of Cholecystokinin in People after Ingestion of Glycomacropeptides (GMPs) Corring, T., Beaufriere, B., Maubois, J.L.
3. The adsorption of lysozyme and chymosin onto emulsion droplets and their association with caseins. Andre de Roos