

Effects of various carbon sources on the production of recombinant phospholipase C (PLC) by *Pichia pastoris*

Sun Yong Kim^{2,3}, Kyung-Ah Han^{1,3} and Jong Il Rhee^{2,3}

Department of Material and Biochemical Engineering¹, Faculty of Applied Chemical Engineering², Bioprocess Technology lab³, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea
Tel : +82-062-530-0847, Fax : +82-062-530-0846

Abstract

The *Pichia pastoris* expression system is widely used for the production of recombinant proteins. In this study, we investigated the characteristics of cell growth and PLC production of recombinant *Pichia pastoris*. Especially, several carbon sources like glycerol, glucose, sucrose, mannose, dextrose, xylitol, lactic acid, and acetic acid etc. were used to fermentations. The PLC activity was measured photometrically.

서 론

Phospholipase는 phospholipids의 ester 결합을 가수분해하는 효소로 phospholipase A1, A2, C, D등 그 종류에 따라 각각 다른 sites를 선택적으로 분해한다. 그 중 phospholipase C (PLC)는 phospholipids의 sn-3이 에스테르화된 phosphocholine이나 phosphoethanolamine 잔기와 같은 극성 head groups을 가수분해한다. 대표적으로 phosphatidylcholine (PC)를 기질로 사용하는 PLC 가수분해 반응에서는 diacylglycerol (DAG)과 phosphorylcholine이 생성되며, 이들 생성물은 포유동물계의 신호전달 과정에서 특정한 작용을 하기 때문에 그 응용 가능성에 관심이 모아지고 있다. 최근 미생물로부터 얻어지는 PLC는 유기 인산의 제조, 광학 이성질적으로 순수한 DAG의 생산 등과 같은 생촉매 합성 반응에 사용되고 있어 산업적으로 그 중요성이 점차적으로 증가하고 있으며 식품, 농업, 종이와 직물 관련 산업에서 광범위하게 응용되고 있다.

메탄자화 효모인 *Pichia pastoris*는 유전자 재조합 단백질을 생산하는데 있어서 많은 장점을 지니고 있는 유용한 숙주세포로 알려져 있다. 효모는 대부분이 자낭균류(Ascomycetes)에 속하는 진핵미생물로서 약 700여 종이 존재한다고 알려져 있으며 Biomass 분야, 대체연료분야, pathology 제어 관련 분야, 특히 효모를 이용한 폐수처

리 분야 등에서 다양하게 활용되고 있다. 재조합 단백질 분야의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 인슐린이나 인터류킨, 인터페론 등의 의약품 등을 미생물을 이용하여 생산하는 경우, 극미량으로 존재하기 때문에 고부가가치 생리활성물질의 대량 생산 system을 필요로 한다. 특히 promoter, 분비 signal, 벡터의 안전성 등을 고려한 고효율 발현 벡터 및 목적 단백질 생산에 적합한 발현 system 선택 및 숙주 개발이 그 핵심 기술이라 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 *Pichia pastoris* X-33/pBPT44를 이용하여 각종 탄소원의 변화가 PLC의 생산에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

Recombinant cell인 *Pichia pastoris* X-33/pBPT44를 균주로 사용하여 activation과 preculture는 기본 배지로써 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose, 10 g/L yeast extract에 100 mg/L zeocin을 첨가하여 사용하였다. 각종 탄소원의 영향을 살펴보기 위한 실험에서는 1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, potassium phosphate buffer(pH 6.0, 1 M), 1.34%(w/v) yeast nitrogen base w/o amino acids (YNB), 4×10^{-5} %(w/v) biotin과 1%(w/v or v/v)의 glycerol, glucose, sucrose, mannose, dextrose, xylitol, lactic acid, acetic acid 등을 첨가하여 사용하였다. 각각의 탄소원에 접종한 균주는 200 rpm, 30°C에서 배양하였고 균이 성장하는 동안 12시간 간격으로 샘플을 채취하여 실험에 사용하였다.

샘플채취 및 전처리

채취한 샘플로 pH를 측정하였다. 한편 4000 g, 4 °C에서 5분간 원심분리하여 상등액과 pellet을 구분하여 보관하여 각각의 필요한 데이터를 위한 분석에 사용하였다.

PLC 분석방법

배양액 내 존재하는 PLC 활성은 p-nitrophenylphosphorylcholine (p-NPPC)을 기질로 하는 S. Kurioka의 spectrophotometric assay법(2)을 변형하여 사용하였다. p-NPPC는 PLC에 의해 p-nitrophenol과 phosphorylcholine으로 분해 되는 데 이 때 생성된 p-nitrophenol이 유색반응을 나타낸다. 이러한 반응을 이용하여 PLC solution 90 μ l와 100 mM p-NPPC 10 μ l (100 ml Borax buffer, pH 7.5)를 혼합한 후 microplate reader

를 이용하여 405 nm에서 PLC 활성을 측정하였다.

세포농도측정방법

배양 중 세포농도를 측정하기 위해서 수집해 놓은 시료에 증류수를 첨가하여 일정 농도로 희석하여 spectrophotometer를 이용해 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 관찰된 흡광도를 이용하여 시간에 따른 성장곡선을 작성하였다.

결과 및 고찰

탄소원에 의한 세포 성장 측정

1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, potassium phosphate buffer(pH 6.0, 1 M), 1.34%(w/v) yeast nitrogen base w/o amino acids (YNB), 4×10^{-5} %(w/v) biotin과 1%(w/v or v/v)의 glycerol, glucose, sucrose, mannose, dextrose, xylitol, lactic acid, acetic acid 등이 첨가된 각각의 배양액을 3시간 간격으로 채취하여 일정 농도가 되게 증류수로 희석하여 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 차이를 이용하여 각각 탄소원이 세포 성장에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다.

탄소원에 따른 pH측정

각기 다른 탄소원이 포함된 배지로부터 균주를 배양함에 따라 3시간 간격으로 샘플을 채취하여 탄소원이 배양중인 *Pichia pastoris*의 pH 변화에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였다.

재조합 *Pichia pastoris*로부터 탄소원의 영향에 따른 PLC 생산량 측정

진탕배양기를 이용하여 재조합 단백질을 생산하는 *Pichia pastoris*를 30 °C, 200 rpm에서 배양하면서 12시간 간격으로 채취한 샘플을 4000 g, 4 °C에서 5분간 원심분리한 후 상등액과 pellet을 나누어 보관하였고, p-NPPC를 이용하여 microplate reader로 405 nm에서 상등액 속에 존재하는 PLC를 정량하여 각 탄소원에 따른 PLC 생산량과의 상관관계를 조사하였다.

요 약

20 g/L peptone, 20 g/L dextrose, 10 g/L yeast extract에 100 mg/L zeocin을 첨가하여 동일하게 전배양 한 재조합 *Pichia pastoris* X-33/pBPT44를 각기 다른 탄소원이 든 배지에 배양하면서 12시간 간격으로 샘플을 채취하여 배양시간에 따른 세포성장, pH, 각 탄소원에 따른 PLC 생산량 등을 측정하였다.

References

1. K. H. Seo, Y. S. Yim and J. I. Rhee (2004), "Production of a phospholipase C by *Bacillus cereus* and its characterization", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **19(4)** : 250-256.
2. S. F. Martin and P. J. Hergenrother (1998), "Application of phospholipases in the edible oil industry", *Fett/Lipid*, **100** : 152-156.
3. J. Xie, O. Zhou, P. Du and Q. Ye (2005), "Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production", *Enzyme and Microbial Technology*, **36** : 210-216.
4. M. Inan and M. M. Meagher (2001), "Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase(AOX1) promoter of *Pichia pastoris*", *J. Biosci. Bioeng.* **92(6)** : 585-589.