

효모 배양액으로부터 재조합 모넨린의 정제와 특성 연구

김 인 호

대전시 유성구 궁동 220 충남대학교 화학공학과 305-764
(접수 : 1998. 5. 15., 게재승인 : 1998. 8. 20.)

Purification and Characterization of Recombinant Monellin Produced from Yeast Culture Medium

In Ho Kim

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Kungdong, Yusunggu, Taejon, 305-764
(Received : 1998. 5. 15., Accepted : 1998. 8. 20.)

The monellin, a sweet-taste protein, was expressed and secreted in *Saccharomyces cerevisiae*. The secreted monellin was concentrated using an ultrafiltration membrane with a nominal molecular weight cut off of 3,000 or by ammonium sulfate precipitation. The monellin was purified by G-25 gel filtration chromatography, followed by CM-Sepharose ion exchange chromatography. The purified monellin was characterized by SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and HPLC. The molecular weight of monellin was found to be 10,700 dalton, and its purity was over 95%.

Key Words : Monellin, Secretion, Purification

서 론

아프리카 딸기로 부터 분리한 감미 물질인 모넨린과 소마틴이 단백질이라는 것이 밝혀진 후(1), 대체 감미 물질로 감미 단백질 연구가 지속되어 왔다. 모넨린(2)과 소마틴(3)은 물 기준으로 설탕의 100,000배의 감미도를 가지고 있으며, 모넨린은 2개의 펩타이드 사슬로 A사슬은 45개의 아미노산 B사슬은 50개의 아미노산으로 구성된 분자량 10,000 Dalton인 단백질이다.

아프리카 딸기로 부터 분리한 감미 단백질 모넨린의 특성 조사가 이루어져(4) 이 단백질을 미생물로 부터 발현, 정제하는 연구가 활발히 진행되고 있다(5). 앞서 보고된 재조합 모넨린은 세포내 단백질이며 다단계의 정제 과정을 거쳐야 했다. 재조합 모넨린을 *Candida utilis* 세포외로 분비시켜 발효 배양액으로 부터 모넨린을 단순하게 정제하고자 하는 연구가 보고되었다(6).

본 연구는 감미 단백질인 모넨린을 *Saccharomyces cerevisiae*에서 분비시켜 배양액으로부터 분리한 연구 결과이다. 재조합 단백질 분비 연구는 *S. cerevisiae*(7), *Pichia pastoris*(8), *Yarrowia lipolytica*(9) 등 여러 효모 균주에서 이루어져 있으며 이중 *S. cerevisiae*에서 α -factor를 이용해서 재조합 단백질의 발현이 많은 연구가 이루어져 왔고, 본 연구에서도 α -factor를

이용하여 모넨린을 효모 배양액으로 분비하도록 했다. 분비된 모넨린과 발효 배지 성분을 분리하여 모넨린을 정제하였고 정제된 모넨린의 특성을 HPLC, SDS-PAGE를 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

재조합 효모

α -factor 분비 시그널을 갖는 재조합 *S. cerevisiae*(10, 11)를 이용하고, 모넨린 단백질의 A사슬과 B사슬이 연결되어 단일 사슬 단백질(5)이 발현되도록 유전자 조작된 *S. cerevisiae*를 사용하였다. 이 효모는 PC 1/1 vector에 alcohol dehydrogenase/ α -factor leader sequence와 단일 사슬 모넨린 유전자를 갖고 있다.

발 효

재조합 *S. cerevisiae*는 leu^- marker를 갖고 있으며 이 균주를 증배양하기 위해 100mL의 leu^- 배지에서 밤새 배양하여 본 배양조에 접종하였다.

본 배양을 수행하기 위해 YPD(Yeast extract 2%, Pepton 1%, Dextrose 2%) 배지 25L를 Chemap 발효조(Swiss)에 채운후 30°C, 200rpm, 1vvm조건으로 8시간 회전 배양하였다. 그 후 세포 농도를 증가시키기 위해 40시간동안 50% 포도당 0.5L를 시간당 12mL로 공급하면서 재조합 효모를 유가배양하였다.

† Corresponding Author · Tel : 042-821-5685

Fax : 042-822-8995

e-mail : ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

발효액 처리

정제를 하기위해 2가지 방법으로 발효액을 전처리 하였다. 첫째 원심분리하여 효모를 제거한 배양액에 황산 암모늄 45%를 가하여 침전을 얻고 이 침전을 녹여 크로마토그래피의 샘플로 사용하였다. 둘째 방법은 정밀여과막(Amcon HIMP01, 0.1µm pore)을 이용하여 배양액에서 효모를 제거하고 얻은 여과액을 한외여과막(Amcon S1Y3, MWCO 3,000)을 이용해 100ml로 농축하는 것이다.

크로마토그래피

황산 암모늄으로 침전시킨 샘플을 G-25 겔 여과 크로마토그래피칼럼(2.5cm D × 40cm L)에서 완충용액(20mM 인산완충액 pH=7.4) 교환을 하였다. 한외여과막으로 농축한 샘플도 같은 완충용액으로 G-25 겔 여과 크로마토그래피하였다. 두 가지 샘플을 35mL CM-Sepharose CL-6B(Pharmacia, Sweden) 겔이 충전된 칼럼(1.5cm D × 20cm L, Pharmacia)에 가하고 위의 완충용액으로 겔을 세척한 후, 0.25M NaCl이 포함된 완충용액으로 모넨린을 용출시켰다.

분석방법

15% SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 Laemmli 방법에 따라 수행하였다(12). 역상 HPLC 실험을 BioRad RP 318 칼럼(Biorad, U.S.A.)으로 수행하였다. 0.05% trifluoroacetic acid(TFA)가 포함된 증류수를 용액A, 0.05% TFA 함유된 acetonitrile을 용액B로 하여 칼럼을 평형화할 때 80%A/20%B 용액을 사용하였다. Monellin을 주입하고 B용액을 20%로 부터 100% 까지 선형으로 증가시켜 조성을 변화시키고 1mL/min 유속으로 45분 동안 HPLC실험을 수행하였다. 이온 교환 HPLC 실험에서 사용한 칼럼은 SP-5PW(Waters, U.S.A.)이었고 용액 A는 2mM pH 7.0 Tris 완충용액, 용액 B는 1M NaCl이 포함된 2mM pH 7.0 Tris 완충용액이었다. 유속은 1mL/min이었고 NaCl구배를 30분 동안 0→0.4M이 되도록 용액A와 용액B의 비를 조절하였다.

겔 여과 HPLC 실험으로 Proteinpak 125 칼럼(Waters, U.S.A.)을 사용하고 0.8 mL/min의 유속으로 10mM Tris 완충용액(pH7)을 칼럼에 Pump(영인 Model 910)로 흘려보내어 Monellin의 분자량과 순도를 측정하였다.

결과 및 고찰

발효

발효개시 8시간 후 효모의 O.D.는 8로 낮았고 그 후 50% 포도당 용액을 펌프로 연속 공급하여 발효개시 48시간 후 OD가 42로 증가하였다(Figure 1). pH는 효모의 성장이 잠시 둔화된 8시간 지점에서 잠깐 상승하였다가 포도당이 투입되면서 계속하여 천천히 감소하였다. 효모의 ADH2 promoter에 의해 모넨린이 발현되어 효모가 알코올을 이용하면서 모넨린이 배지로 분비되었다. 발효 후 28, 48, 56 시간 지점의 발효 배지를 전기영동한 결과 모넨린이 배지에 존재함을 확인할 수 있었다.

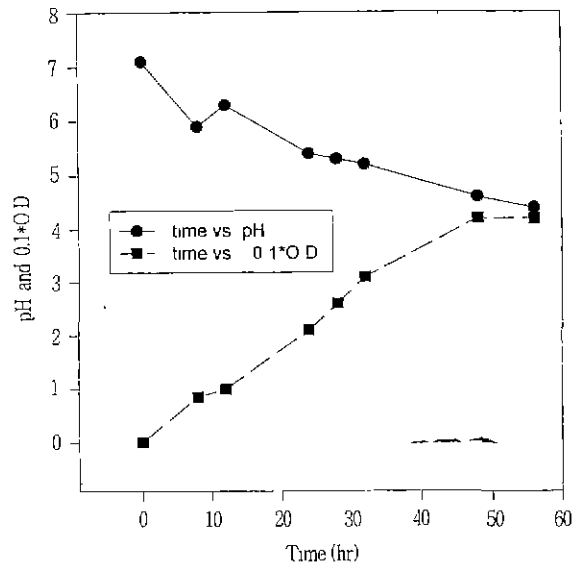


Figure 1. Time course of fermentation ; 100mL of leu⁻ broth transferred to 2.5L YPD fermentation medium ; 500mL of 50% glucose fed to the 2.5L medium during 8-48 hrs , fermentation conditions : T=30°C, rpm=200, air flow rate=1vvm ; SDS-PAGE of fermentation samples at 28, 48 and 56 hr is shown.

G-25 크로마토그래피

G-25 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 단백질 용액을 이온 교환 크로마토그래피용 완충용액으로 교환하였다. 이온 교환 크로마토그래피의 진단재로 G-25 겔 여과 크로마토그래피하는 방법은 혈액단백질의 분리에서 주로 사용되는 방법이다(13). G-25 과정에서 완충용액 교환이 주 목적이지만 일부의 정제 효과도 있는데 저분자의 물질을 제거하는 것이 그것이다. 칼럼 겔 루피의 약 30%에 해당하는 겔 사이의 공간을 통하여 용리액이 배출되면 모넨린을 포함하는 주 피크가 배출됨을 Figure 2에서 볼 수 있었다. Figure 2A에서 7, 8번 분획에서 전기영동 결과 모넨린이 포함됨을 확인할 수 있었다. 첫번째 단백질 피크 이후에 나타나는 여러 피크들은 단백질이 포함되지 않는 배지 내의 여러 성분들에 기인한 것이다.

Figure 2A와 Figure 2B를 비교하면 주 피크 이후의 피크 모양이 다르다. 전자는 황산암모늄으로 전처리한 샘플을 G-25 겔 여과한 것이고 후자는 막으로 전처리하여 얻은 샘플을 G-25 겔 여과한 것이다. 막으로 전처리한 샘플이 저분자 물질이 적음을 알 수 있다. 황산암모늄 처리로 배양액 침전을 얻어 그 침전을 다시 녹인 것이기 때문에 배양액 성분이 대부분 농축되어 Figure 2A에서 저분자 유래 피크가 크지만, 막으로 전처리 한 것은 분자량이 모넨린보다 작은 여러 성분이 S1Y3 막을 빠져나갔기 때문에 저분자량의 불순물이 감소하였다고 생각된다.

CM-Sepharose 크로마토그래피

Figure 3는 G-25 겔 여과한 배양액 샘플을 양이온교환겔인 CM(Carboxymethyl) Sepharose 겔에 주입하고 20mM 인산 완충용액으로 세척한 후 0.25M NaCl이 함유된 20mM 인산 완충

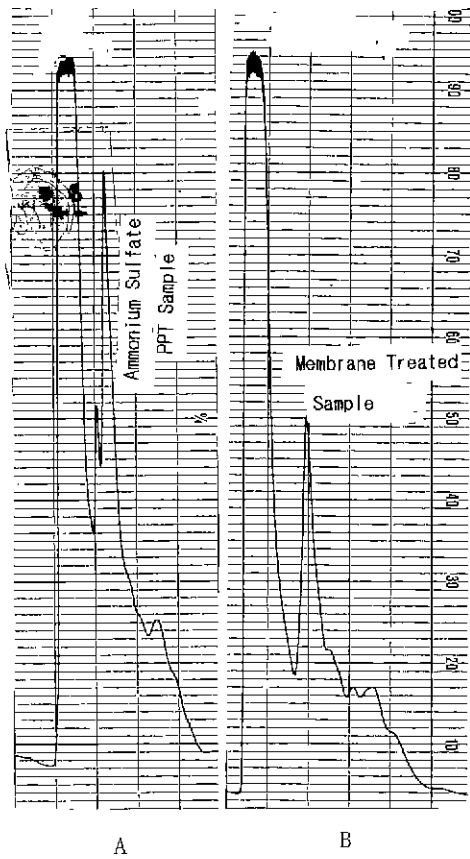


Figure 2. Gel filtration chromatograms of concentrated samples ; A : concentration by ammonium sulfate precipitation ; B : concentration by ultrafilter ; major peaks contain monellin protein as shown above as numbers 7 and 8 ; following peaks after major peak correspond to coloring material from fermentation medium ; purification conditions : column=2.5 cm × 40 cm ; flow rate=60 mL/hr.

용액으로 모넨린을 분리한 크로마토그램이다. 주입 샘플에는 배양액으로 부터 유래된 많은 색질이 있기 때문에 샘플 주입과 겔을 세척하는 동안 UV모니터에서 발생한 신호는 레코더의 기록 범위를 초과하였다. 세척이 진행되고 신호가 감소하며 신호값이 blank 기준선에 수렴하는데 많은 시간이 소요되기 때문에 세척 완충용액의 부피를 칼럼 부피의 10배로 제한하여 세척하였다.

분리된 모넨린을 전기 영동한 결과가 Figure 4에 제시되었다. 왼쪽부터 제 1 레인은 표준 분자량 표시, 제 2 레인은 1mg/mL 농도의 분리된 모넨린, 제 3 레인은 CM-Sephrose 크로마토그램(Figure 3)에서 왼쪽에서 두 번째 피크, 제 4 레인은 막 S1Y3 농축액, 그리고 제 5 레인은 배양액의 전기영동 결과이다. 제 4, 제 5 레인의 띠에서 보듯이 배양액에는 모넨린 만이 보이고 전기영동상에는 배양액내의 색질물질이 나타나 있지 않다 오른쪽에서 왼쪽으로 진행하여 살펴보면 정제과정 중에 모넨린의 농도가 증가함을 알 수 있다. 분자량 표시와 비교하면 모넨린은 분자량이 10K Dalton 부근이었다.

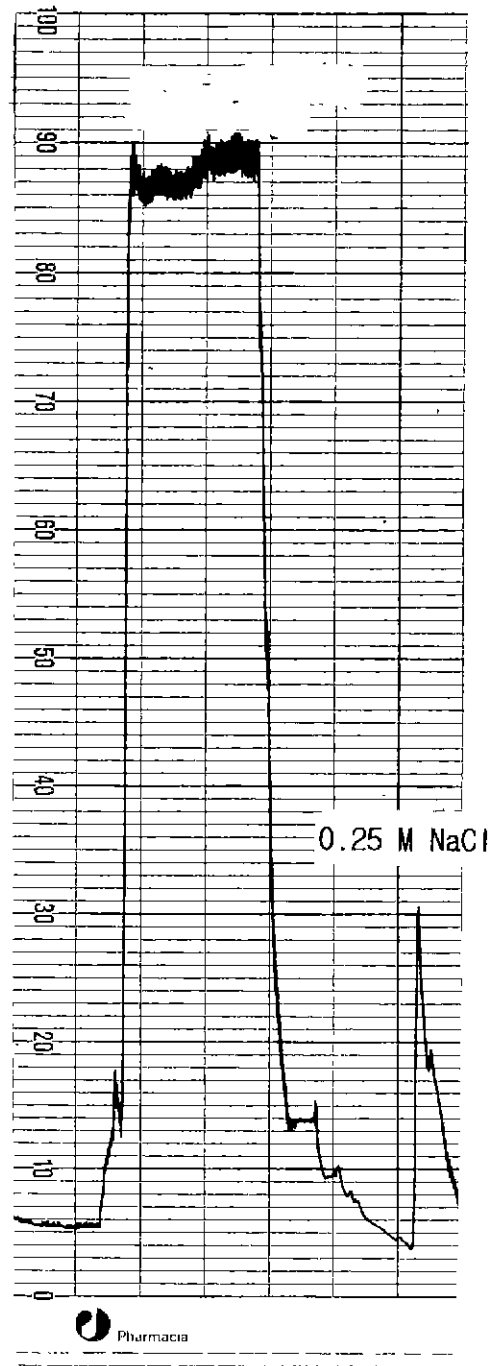


Figure 3 Ion exchange chromatogram of sample obtained from gel filtration chromatography , purification conditions : column=1.5 cm × 20 cm , flow rate=60 mL/hr ; elution buffer =20 mM pH7.4 phosphate buffer with 0.25M NaCl.

역상, 이온교환 HPLC 와 겔 여과 HPLC

모넨린은 체류시간 32분 대에 나타났으며 이는 Acetonitrile 농도가 약 50% 일 때 역상 겔에서 탈착되어 용리되는 것이다 (Figure 5). 32분의 피크가 모넨린 단백질임을 전기영동으로 확인하였다. 32분대 모넨린 피크는 자세히 보면 2개의 피크로 분리되어 있는데 SP 이온교환 HPLC에서도 2개 피크가 인접하여 나타났다(Figure 6). 2개의 다른 모넨린은 전기적 특성이 다르

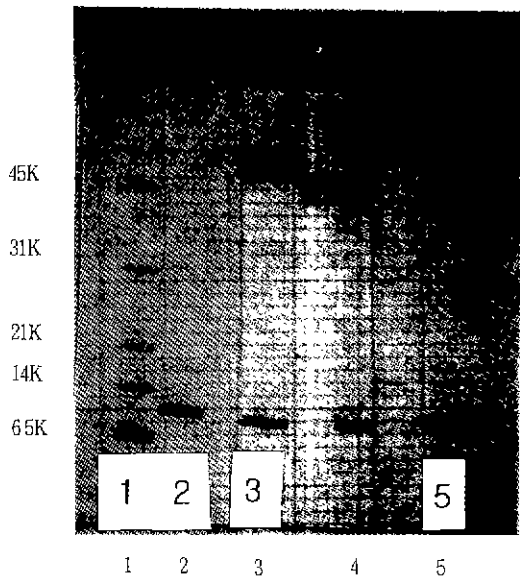


Figure 4. SDS-PAGE of purification step samples : lane 1 . molecular weight marker ; lane 2 : monellin standard (1mg/mL) ; lane 3 . monellin fraction from CM-Sepharose chromatography ; lane 4 : concentrate by ultrafiltration ; lane 5 : culture medium.

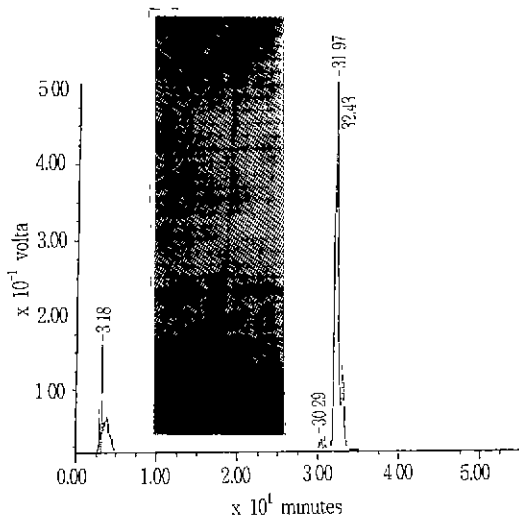


Figure 5. Reverse phase HPLC chromatogram of final monellin sample ; column . Biorad RP 318 . flow rate : 1mL/min ; gradient condition : solvent A = distilled water with 0.05% TFA, solvent B = acetonitrile with 0.05% TFA, linear gradient from 20% B to 100% B for 45 min

고 이온 교환젤에 결합강도가 다를 수 있다. 전기적 특성이 다르게 되는 원인으로 생각할 수 있는 것은 모넨린이 효모 세포외로 배출될 때 α -factor leader 단백질이 잘라지게 되는데 이 때 모넨린의 아미노산 조성이 맞게 달라지는 것으로 사료된다. 2가지 다른 모넨린의 크기는 다음의 겔 여과 HPLC에서는 구별되지 않고 겔 여과 HPLC로는 모넨린이 단일피크로 나타났다(Figure 7). Dextran blue (MW = 2,000,000), Ovalbumin (MW = 43,000), RNase (MW = 13,700)을 분자량 표준 물질로 하여 모넨린의 분자량을 측정 한 결과 모

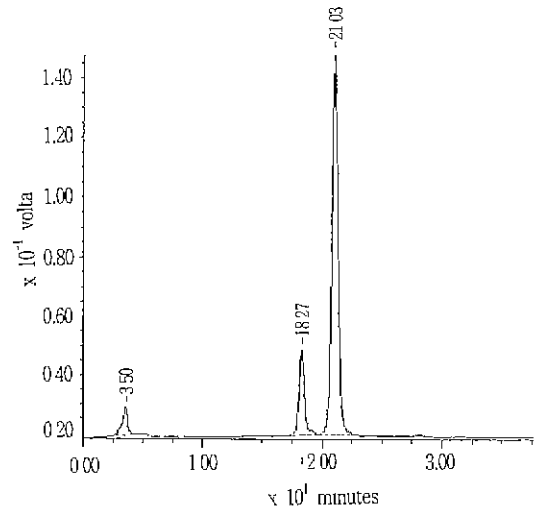


Figure 6. Ion exchange HPLC chromatogram of final monellin sample ; column : SP-5PW ; flow rate . 1mL/min.

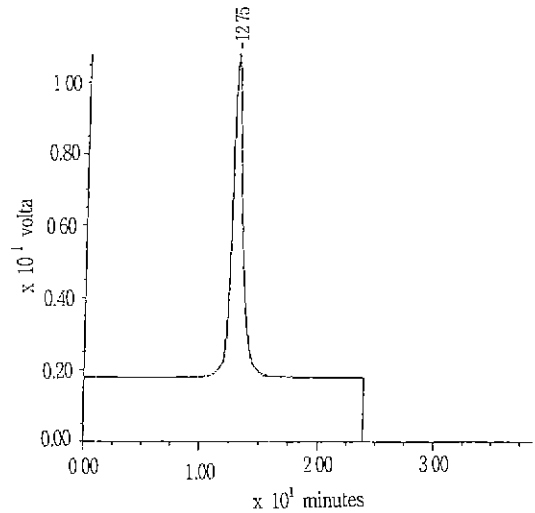


Figure 7. Gel filtration HPLC chromatogram of final monellin sample ; column : Proteinpak 125 ; flow rate . 0.8 mL/min ; solvent : 10 mM Tris buffer (pH=7).

넨린의 분자량은 10,700로 문헌에 보고된 값과 일치하였다(14). Gel 여과 HPLC로 분석한 모넨린의 순도는 피크 면적 적분값을 기준으로 96%이었다.

요 약

감미 단백질인 모넨린을 제조할 효모 배양액으로부터 정제 하였다. 사용된 제조할 효모는 leu⁻ PC 1/1 ADH/ α -factor *S. cerevisiae*로 모넨린 유전자를 갖고 있고, 발효액내에서 포도당이 고갈되고 효모가 에틸 알코올을 기질로 사용할 때 모넨린이 발현 분비되었다. 분비된 모넨린을 막이나 침전을 이용하여 농축하고 G-25 겔 여과 크로마토그래피와 CM-Sepharose 이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 모넨린을 SDS-PAGE와 HPLC로써 일부 특성을 조사하였다. 모넨린의 분자량은 10,700 dalton 이었고 순도는 95% 이상이었다.

참 고 문 헌

1. Kim, S.H., C.-H. Kang and J.-M. Cho (1991), Sweet Proteins, Biochemical Studies and Genetic Engineering (D.E. Walters, F.T. Orthofer and G.E. DuBois, eds) *ACS Symp. Ser.*, **450**, pp. 28-40, Am. Chem. Soc., Washington, D.C.
2. Penarrubia, L., R. Kim, J. Giovannoni, S.-H. Kim and R.L. Fisher (1992), Production of the Sweet Protein Monellin in Transgenic Plants, *Bio/Technology*, **10**, 561-564.
3. Lee, J.H., J.L. Weickmann, R. K. Koduri, P. G.-Dastidan, K. Saito, L.C. Blair, T. Date, J. S. Lai, S. M. Hollenberg and R.L. Kendall (1988), Expression of Synthetic Thaumatin Genes in Yeast, *Biochemistry*, **27**, 5101-5107
4. Bohak, Z and S.-L. Li (1976), The Structure of Monellin and Its Relation to the Sweetness of the Protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 153-170.
5. Kim, I.H. and K.J. Lim (1996), Large-scale Purification of Recombinant Monellin from Yeast, *J. Ferm. Bioeng.* **82(2)** 180-182.
6. Kondo K. Y.Miura, H. Sone, K Kobayashi and H. Iijima (1997), High-level Expression of a Sweet Protein, Monellin, in the Food Yeast *Candida Utilis*, *Nat. Biotechnol.*, **15(5)**, 453-457.
7. R.Dansby (1997), Sweet Science' Overexpression of Monellin in Yeast, *Nat. Biotechnol.*, **15(5)**, 419-420.
8. Cregg, J.M., T.S. Vedvick and W.C. Raschke (1993). Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia Pastoris*, *Bio/Technology*, **11**, 905-910.
9. Fabre, E., J.-M. Nicaud, M.C. Lopez and C. Gaillardind (1991), Role of the Proregion in the Production and Secretion of the *Yarrowia lipolytica* alkalined extracellular protease, *J. Biol. Chem.*, **266**. 3782-3790.
10. Kim, S.-H., C.-H. Kang, R. Kim, J.M. Cho, Y.-B. Lee and T.-K. Lee (1989). Redesigning a Sweet Protein : Increased Stability and Renaturability, *Protein Engineering*, **2**, 571-575
11. Kim, I.H. (1991), Purification and Characterization of Recombinant Secreted Proteins, *Proc. Second Kor-US Joint Seminar on Bioprocess Technol.*, Dec. 12-17, 63-67.
12. Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Heat of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**. 680-685
13. Janson, J.-C. and P. Hedman (1982). Large-Scale Chromatography of Proteins (A. Fiechter, ed), *Adv. Biochem. Eng.*, pp. 43-99, Springer Verlag, New York.
14. Morris, J.A., R. Martenson, G. Deibler and R.H. Cagan (1973), Characterization of Monellin. a Protein That Tastes Sweet. *J.Biol. Chem.*, **25**, 534-539