

유전자 재조합 단백질 생산에 있어서 *Pichia pastoris* 와 *Hansenula polymorpha*를 이용한 최적 발현 방법 개발

†강 환 구 · 전 희 진 · 김 재 호
한남대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2000. 4. 7., 게재승인 : 2000. 4. 22.)

The Optimization of Expression System for Recombinant Protein Production by *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*

Whankoo Kang†, Heejin Chun, and Jaeho Kim
Department of Chemical Engineering, Hannam University, Taejon 306-791, Korea
(Received : 2000. 4. 7., Accepted : 2000. 4. 22.)

Pichia pastoris and *Hansenula polymorpha*, the methylotrophic yeasts have been widely used as a host for the production of eudaryotic proteins due to the advantages related to their inherited characters. This paper describes the method to enhance the productivity of recombinant proteins by *P. pastoris* and *H. polymorpha*. In the production of recombinant proteins using a fed batch fermentation system, the effects of specific growth rate on the specific expression rate of recombinant proteins were studied. In both species, the expression system of recombinant proteins using the fed batch fermentation was optimized.

Key Words : *hansenula polymorpha*, *pichia pastoris*, fermentation

서 론

현재 유전자재조합 단백질 생산을 위해 주로 쓰이고 있는 host로는 *E. coli*, *S. cerevisiae* 등의 yeast, 그리고 동물세포인 CHO cell 등이 있으며(1,2,3) 이들 중 Yeast는 *E. coli*와 비교하여 몇 가지 장점을 가지고 있다(4,5). Yeast는 *E. coli*와 달리 유전적으로 고등생물과 동일한 진핵세포로서 고등 생물 유래의 유전자와 전사 및 번역 시스템이 유사하고, splicing을 통한 intron의 제거가 가능하며 고등 동물의 골지체와 유사한 분비기관을 갖추고 있어서 번역후 수식(post-translational modification)을 통해 활성화된 단백질을 생산, 분비시킬 수 있다. 또한 yeast는 *E. coli*에 비해(6) 유전자 재조합 단백질을 더 효율적으로 세포 밖으로 분비 생산하여 이 단백질의 분리 정제에 도움을 줄 수 있고, yeast에서 단백질을 생산할 때에는 의약품 단백질의 경우에 꼭 제거되어야만 하는 Endotoxin 등이 *E. coli*와는 다르게 문제가 되지 않는 장점을 가지고 있다. 이러한 yeast중에 대표적으로 사용하고 있는 *S. cerevisiae*

는 1981년 이를 이용하여 유전자 재조합 단백질 생산이 보고된 이래 수 많은 연구자들에 의해 활발한 연구가 진행되어 왔고 실제 회사들에서는 이 *S. cerevisiae*를 이용하여 의약품용 외래 단백질을 생산하고 있다. 그러나 *S. cerevisiae*에는 높은 발현률을 얻기 위해서는 multi-copy plasmid가 필요하고 큰 규모의 발효조에서 고농도 세포배양을 할 때 이들 plasmid의 distribution, copy number, stability등이 자주 문제가 되며, glycolytic gene유래의 promoter들은 대부분 constitutive promoter 이어서 이를 이용하여 단백질 발현을 하는 경우에는 plasmid를 잃은 cell들이 dominating 해지므로 문제가 되어서 조절할 수 있는 promoter들도 정확하게 control하기 어려운 문제점이 있다(7).

이러한 문제를 해결하는 대안으로 최근에 두 개의 facultative methylotrophic yeast인 *Hansenula polymorpha*(8)와 *Pichia pastoris*가 주목을 받게 되었다. 이들의 유사점은 두 균주 모두 methylotrophic yeast이고 외래유전자가 chromosomal DNA에 integration될 수 있으며 또한 methanol 이용하는 pathway가 거의 비슷하고 이 pathway상의 enzyme들에 대한 promoter(MOX or AOX1)가 이용되어지며 이 promoter가 매우 강력하다는데 있다. 그러나 이 두 균주는 다음과 같은 여러 가지 다른 성질을 가지고 있는 것으로 보고된다. *Hansenula polymorpha*는 *Pichia pastoris*와 다르게 thermotolerant methyl-

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Hannam University, Taejon 306-791, Korea
Tel : 042-629-7932, Fax : 042-623-9489
E-mail : wkang@eve.hannam.ac.kr

otrophic yeast이므로 온도, pH, C source 및 N source 등에 대한 생육최적조건이 서로 다르다. 그리고 *H. polymorpha* 경우에는 재조합 단백질 발현을 위한 promoter로 methanol oxidase로부터 유래된 MOX promoter 또는 formate dehydrogenase로부터 유래된 FMD promoter를 쓰는 반면 *P. pastoris*의 경우는 AOX1(alcohol oxidase 1) promoter를 주로 사용한다. 또한 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*는 carbon source에 의한 repression 형태도 다른 것으로 보고 되므로 이 두 균주 경우에 있어서 batch 및 fed-batch의 최적 발현조건이 서로 다를 수 있다(9).

이러한 두 균주의 비교를 통한 재조합 단백질 발현 최적화는 이들 methylotrophic yeast를 재조합 단백질 host로 이용하는 경우, 특히 산업체에서 methylotrophic host를 선택하는 기초자료 및 재조합 단백질 생산 최적화 자료를 제공되어 질 수 있다.

재료 및 실험방법

사용균주

본 연구에 사용되는 *P. pastoris*는 histidine auxotroph인 GS 115 strain이며 이 *P. pastoris*와 발현 키트는 invitrogen사에서 구입하였으며 실험에서 사용할 균주는 세포막 분비를 하게 되는 albumin 유전자를 pHIL-S1 expression vector(AOX1 promoter)에 넣어 host genome AOX1 locus에 integration된 GS115/His⁺ Mut^r albumin secreted strain이다. 그리고 *H. polymorpha* host는 leucine 과 uracil auxotroph이며 MOX (Methanol oxidase) promoter, MOX terminator와 albumin gene segment를 가진 vector를 이용하였다.

배지 및 배양방법

*P. pastoris*와 *H. polymorpha* 균주의 종배양은 minimal media에서 진행되었는데 glycerol 10 g/L, yeast nitrogen base without amino acid(YNB) 13.4 g/L, biotin 4 g/L가 포함되어 있다. 이 배지에 -70 °C에서 보관되는 1 ml seed stock vial로부터 종배양 배지 100 ml이 들어있는 멸균된 진탕플라스크로 접종하였고 배양조건은 *P. pastoris*의 경우 250 rpm, 30 °C 이었고 *H. polymorpha*는 37 °C, 250 rpm이었는데 균주가 접종된 진탕플라스크를 각각 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 사용하였다. minimal media 경우는 50 °C 정도로 가열하여 YNB를 녹인 후 다른 구성성분을 섞어 필터로 멸균하며 그 외 complex media(효모추출물 2%, 글리세롤 1%)의 경우는 autoclave를 통해 멸균하고 배지에 사용되는 메탄올은 필터로 멸균한다. 기초적인 회분식 실험을 위한 플라스크 배양은 500 ml의 진탕플라스크를 이용하였는데 100 ml의 배지에 종배양액 1%를 접종한후 250 rpm의 진탕배양기에서 실험하였다. complex 배지는 기본적으로 글리세롤 10 g/L, 효모추출물(yeast extract) 20 g/L이었고 메탄올은 메탄올 농도 실험을 제외하고 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*의 경우 각각 8 g/L, 12 g/L 농도를 사용하였다. Fermenter에서의 실험은 5 L 발효기(한국발효기(주))를 사용하였다. 글리세롤 10 g/L, 효모추출물 20 g/L로 조성된 배지에 종배양액을 5% 접종하여 실험을 진행하였다. 이때 배양조건은 *P. pastoris*의 경우 30 °C, 300~800 rpm, pH 5.5내지 6 이었고 *H. polymorpha*의 경우

온도는 37 °C이었고 다른 조건은 *P. pastoris*경우와 같았다.

분석방법

실험중 세포의 농도는 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 분광흡도계(Spectronic 21D, Milton Roy)를 이용하여 660 nm에서의 흡광도(O.D. : optical density)로 측정하였다. 배지중의 글리세롤 농도는 배양액을 13,000 g로 2분간 원심분리하고, 여기서 얻은 상등액을 글리세롤 농도 1 g/L이하가 되게 희석한 후 글리세롤 분석용 시약(Triglyceride, Sigma)을 사용하여 분석하였는데 희석된 배지를 10 µl 취하여 분석시약 1 ml에 넣고 37 °C 항온조에 5분간 방치하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하고 이 값을 미리 구한 검량선과 비교하여 글리세롤의 양을 계산하였다. 본 실험의 목적 단백질인 albumin은 분비형태로 발현되며 생성된 albumin의 양을 정량분석하기 위하여 세포배양후 13,000 g에서 2분간 원심분리하고 이때 상등액을 가지고 분비된 albumin을 얻고 SDS PAGE / Silver, Coomassie staining 방법으로 알고있는 양의 albumin standard와 비교하여 알게 되는데 이때 12% polyacrylamid gel과 5% stacking gel이 사용되어지고 이 경우 67 KDBand가 나타나게 된다. 또한 세포내에 존재하는 albumin의 정량을 위하여 위의 원심분리후 얻어지는 세포침전을 glass bead와 beadbeater를 이용하여 분쇄하고 이를 다시 10,000 g에서 1분간 원심분리하여 얻은 상등액을 SDS PAGE/ western blotting하여 알고 있는 양의 albumin standard와 비교하여 정량하였다. 이때 standard albumin은 sigma사의 제품을 이용하였다. 배지중 메탄올 분석은 Gas Chromatograph(DS6200, Donam)에서 수행되었다. 사용된 column은 길이 6 ft의 녹슬지 않는 stainless steel이고 충전물질은 Hayesep Q(CRS)이며 불꽃 이온화 검출기(FID)를 이용하였다. carrier gas는 헬륨을 사용하였고 분석조건은 주입부 180 °C, 오븐 130 °C, 검출부는 200 °C이었다.

결과 및 고찰

AOX1 과 MOX promoter의 글리세롤에 의한 repression

본 실험에서는 탄소원으로서 글리세롤이 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*의 AOX 1 및 MOX promoter repression에 미치는 영향을 조사하였다. 이 결과가 Figure 1에 보여진다. *P. pastoris*의 경우 글리세롤농도가 1 g/L인 상태에서도 최대값의 약 10% 정도 발현이 이루어짐을 알 수 있다. *H. polymorpha*의 경우도 배지내 글리세롤의 농도가 0.5 g/L 정도에서 albumin 발현이 시작되는 것을 볼 수 있다. 이 결과로서 두 균주 모두 Fed batch 시 글리세롤을 적절히 공급하는 것이 탄소원에 의한 AOX 1 및 MOX promoter repression을 줄일 수 있는 방법임을 알 수 있었다. 또한 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*를 비교해 보면 *H. polymorpha*가 *P. pastoris*보다 글리세롤에 의한 promoter repression이 심함을 알 수 있다.

Inducer로서 메탄올 농도와 induction 시기가 발현에 미치는 영향

*P. pastoris*와 *H. polymorpha*를 이용하여 AOX 1 또는 MOX promoter를 induce하는 메탄올 농도와 메탄올의 induction

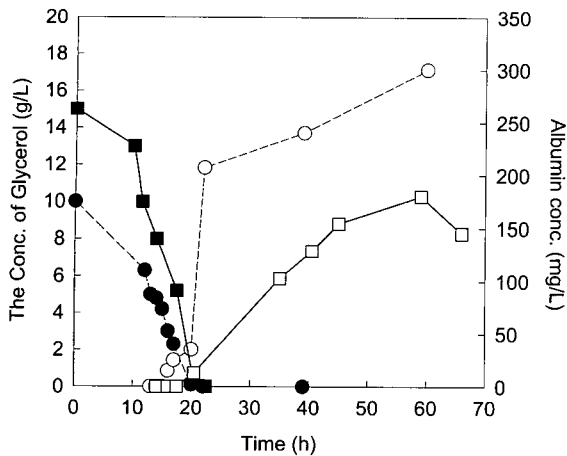


Figure 1. The effect of glycerol on albumin expression in *P. pastoris* and *H. polymorpha*.
 ●-● : glycerol conc. - *P. pastoris*, ○-○ : Albumin conc. - *P. pastoris*, ■-■ : glycerol conc. - *H. polymorpha*, □-□ : albumin con - *H. polymorpha*

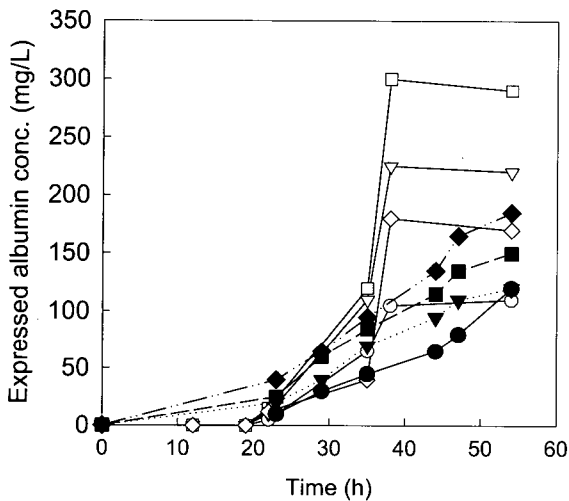


Figure 2. The effect of methanol concentration on albumin expression by *P. pastoris* and *H. polymorpha*.
 ○-○ : 3 g/L - *P. Pastoris*, ▽-▽ : 5 g/L - *P. Pastoris*, □-□ : 8 g/L - *P. Pastoris*, ◇-◇ : 13 g/L - *P. Pastoris*, ●-● : 3 g/L - *H. p. polymorpha*, ▽-▽ : 5 g/L - *H. polymorpha*, ■-■ : 8 g/L - *H. polymorpha*, ◆-◆ : 13 g/L - *H. polymorpha*

시기가 albumin 발현에 미치는 영향을 조사하였다. *P. pastoris*의 경우 메탄올 농도 8 g/L에서 약 300 mg/L의 albumin이 생성되어 3 g/L에 비해 약 3배 이상의 albumin을 생산하였고 이 결과가 Figure 2에 보여진다. 그림에서 알 수 있듯이 *H. polymorpha*의 경우 메탄올 농도 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 13 g/L로 증가할수록 albumin 발현량도 증가하여 13 g/L에서 O.D. 23의 세포농도와 185 mg/L의 albumin을 발현함을 알 수 있었다. 이 결과 *P. pastoris* 경우 최적 메탄올 농도가 *H. polymorpha*에 비해 낮음을 알 수 있었다. 또한 메탄올에 의한 induction시기가 재조합 albumin 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 초기 세포성장단계에 메탄올을 첨가하여 induction시킨 경우와 발효시작 후 O. D. 4정도되는 exponential growth stage에서 메탄올을 첨가하는 경우를 비교하였

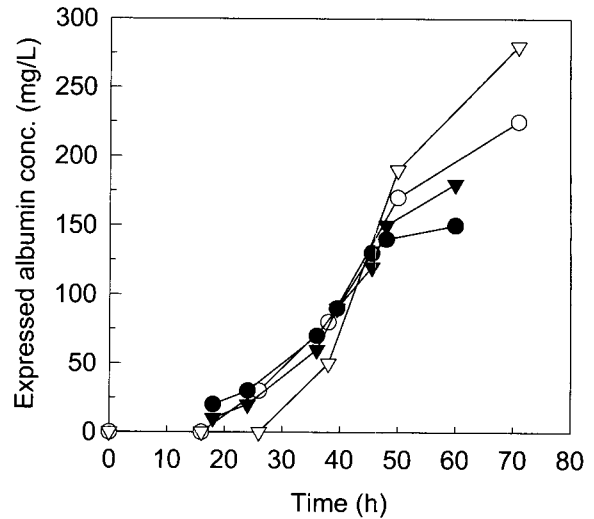


Figure 3. The effect of induction time on albumin expression by *P. pastoris* and *H. polymorpha*.

○-○ : methanol was added at initial - *P. pastoris*
 ▽-▽ : methanol was added at 26 hrs - *P. pastoris*
 ●-● : methanol was added at initial - *H. Polymorph*
 ▼-▼ : methanol was added at 26 hrs - *H. Polymorph*

다. 이 결과가 Figure 3에 보여진다. *P. pastoris*와 *H. polymorpha* 두 경우 모두 albumin 생산성이 O.D. 4정도에서 메탄올을 첨가하여준 경우가 초기 세포 성장단계에 메탄올을 첨가한 경우에 비해 약 20 % 정도 증가함을 알 수 있었다. 이는 생성된 albumin의 protease에 대한 노출시간이 짧고 또한 초기에 집어넣은 메탄올에 의한 cell 성장저해 및 초기부터 생성된 albumin에 의한 cell의 load가 적었기 때문으로 생각된다.

Albumin발현에 미치는 pH의 영향

배양액의 초기 pH가 albumin생산에 미치는 영향을 조사하였는데 이 결과가 Figure 4에 보여지는데 *P. pastoris*의 경우 세포성장과 albumin 발현량 모두 큰 차이를 보이지 않았으나 pH 5에서 약간 높은 albumin 생산성을 보였다. *H. polymorpha*의 경우 세포성장에는 별다른 차이를 보이지 않았으나 albumin 발현량은 pH 5와 6에서 거의 비슷하여 O.D. 23에서 약 200 mg/L의 albumin을 발현하였지만 pH 8에서는 이의 절반 수준에 그쳤다. albumin의 분해정도에 있어서는 pH의 5.0일 때는 분해현상이 줄어든 반면 pH 6에서는 25 % 그리고 pH 7, 8에서는 생산된 albumin의 50 %정도가 분해됨을 확인 하였다. 이 결과를 통하여 *H. polymorpha*의 배양시 pH를 5에서 6 정도로 유지하는 것이 좋음을 알 수 있었다.

Fed batch 배양

Fed-batch 방법을 이용하여 두 균주에 있어서 최대 albumin 발현량과 최적 배양방법을 비교하는 실험을 진행하였다. *P. pastoris*의 5 L 발효조에서의 fermentation profile은 Figure 5, Figure 6, Figure 7에 나타나 있으며 실험 조건은 30 °C, pH 5.5 내지 6.0, DO 2 내지 3 % 이었고 초기 배양액 부피는 2 L 이었다. Figure 5에서는 전체 발효공정을 2 단계로 나누어 첫 번째 단계에는 글리세롤만 공급한 후 약 38시간경 O.D.가 약 40에서 글리세롤의 공급속도를 1/3 로 낮추고 메탄올을 함께

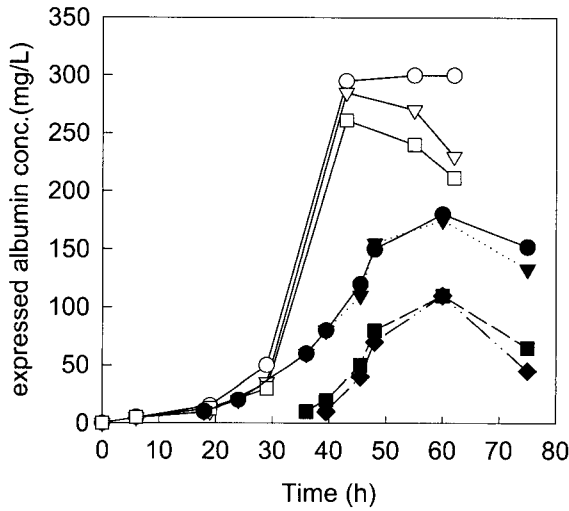


Figure 4. The effect of pH on albumin expression by *P. pastoris* and *H. polymorpha*.
 ○—○ : pH 5 - *P. pastoris*, ▽—▽ : pH 6 - *P. pastoris*, □—□ : pH 8 - *P. pastoris*, ●—● : pH 5 - *H. polymorpha*, ▾—▾ : pH 5 - *H. polymorpha*, ■—■ : pH 5 - *H. polymorpha*, ◆—◆ : pH 5 - *H. polymorpha*

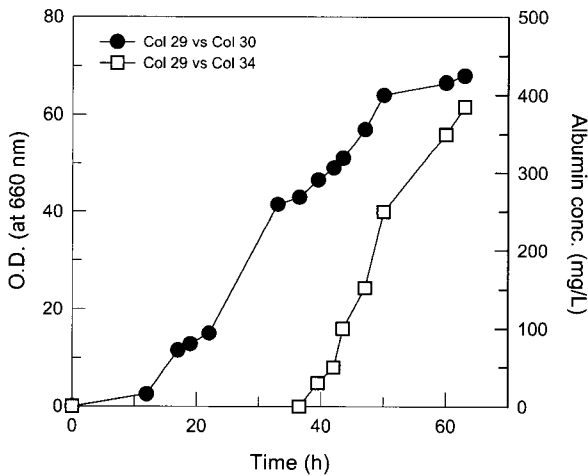


Figure 5. Fed batch fermentation profile of *P. pastoris* with mixed feed of glycerol and methanol.
 Between 19 and 35hrs, glycerol was fed at 0.2 g/min. Glycerol feeding was initiated from 37.5 hrs at 0.083 g/min (1/3 of maximum consumption rate). Methanol was fed to be maintained at 8 g/L concentration.

공급(mixed feeding)하여 글리세롤 농도를 0으로 유지하였으며 아울러 메탄올 농도를 8 g/L로 유지하였다. 이때 관측된 바로는 O.D.가 65까지 이르렀으나 albumin 발현량은 겨우 400 mg/L에 불과해 글리세롤과 메탄올의 mixed feeding시 글리세롤에 의한 AOX1 promoter repression이 매우 심함을 알 수 있었다. 따라서 Fed-batch 방법을 메탄올 공급만으로 바꾸어 보았다. Figure 6에 나타나는 것처럼 발효시작후 약 30시간동안 비성장속도를 약 0.9hr⁻¹로 유지하도록 글리세롤만 공급한 후 O.D. 약 50에서 메탄올만 0.13 g/min의 속도로 공급하여 메탄올 농도를 8 g/L로 유지하였다. 이 결과 O.D. 약 65에서 2 g/L의 albumin을 얻을 수 있었다. 이 수치는 글리세롤과 메탄올 mixed feeding에 비해 5배정도 높으며 알려진

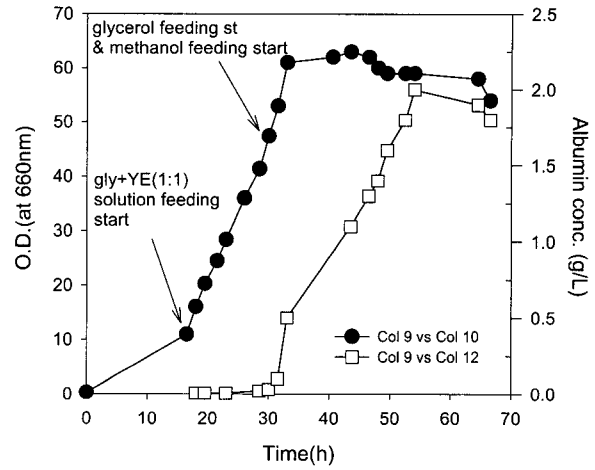


Figure 6. Two stage fed batch fermentation profile of *P. pastoris* (abrupt change feeding)
 Glycerol was fed that μ can be maintained at 0.1 hr⁻¹, between 16 and 28 hrs. After 28 hrs, only methanol was fed to be maintained at 8 g/L.

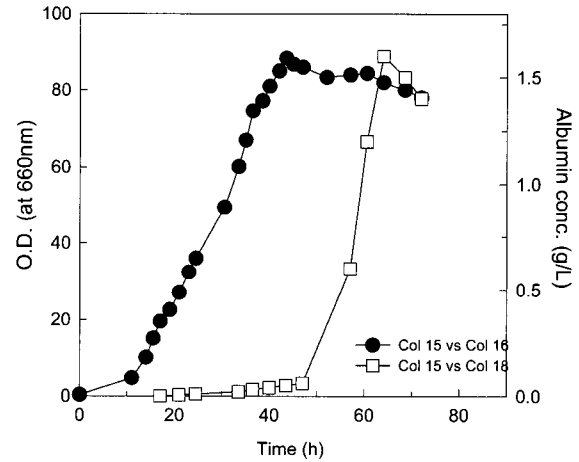


Figure 7. Two stage fed-batch fermentation profile of *P. pastoris* (gradual change feeding)
 Between 15 and 40 hrs, that μ can be stepwisely decreased from 0.1 through 0.08, 0.05 to 0.02 hr⁻¹. After 40 hrs, only methanol was fed.

상업적 albumin 발현 수준과 비교해 손색이 없는 수치이고 O.D. 200이상의 고농도 배양을 실시할 경우 약 5 g/L 이상의 albumin을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 Figure 7에서는 *P. pastoris*를 이용하여 비성장속도를 점차 낮춘 다음 메탄올로 공급을 바꾸어주는 방법으로 Fed-batch를 진행하였는데 이는 Figure 6에서의 글리세롤을 이용하여 비성장속도 0.09 hr⁻¹로 세포를 자라게 한후 직접 메탄올로 전환할 경우에 따른 AOX1 promoter의 induction이 극대화 되지 않을까 하는 점을 확인하려 함이었다. 발효 시작 15시간부터 글리세롤 배지를 공급하고 이때 비성장속도를 0.1 hr⁻¹로 유지하였다. 이 후 30시간이 경과되는 시점부터 비성장속도를 0.08, 0.05, 0.02 hr⁻¹로 점차 낮추어 주면서 O.D. 90까지 자라게 한 후 메탄올만으로 바꾸어 주었다. 실험이 진행되는 동안 메탄올은 배양초기 0.5 g/L를 넣어주었고 접종 후 10시간이 경과한 다음 4 g/L가 되게 하였고 글리세롤 배지를 공급

하는 시점부터 8 g/L로 맞추어 준 후 이 농도를 유지하였다. 이 결과 O.D. 90에서 약 1.6 g/L의 albumin을 생성하였다. 이는 Figure 6의 결과와 비슷한 수치이다. 이로서 *P. pastoris*의 경우 fed-batch 방법을 이용한 세포 배양시 mixed feeding은 바람직 하지 않고 또한 글리세롤 공급을 줄여줌 없이 바로 메탄올로 바꾸어도 albumin 발현에는 지장이 없음을 알 수 있었다.

한편 *H. polymorpha*의 경우에 여러 가지 방법으로 fed batch 실험을 진행하였다. 그 결과를 Figure 8, 9에 보였는데 배양온도는 37°C이었고 다른 실험조건은 *P. pastoris*의 경우와 동일하였다. Figure 8에서는 배양액을 공급하는 동안 비성장속도를 0.1 hr⁻¹로 유지시키면서 O.D. 40 정도까지 키웠다. O.D. 40 이후 비성장속도를 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 hr⁻¹로 점차 낮추어 주면서 O.D. 80까지 자라게 한 후 메탄올만으로 바꾸어 주었다. 이 때 메탄올은 점중시 0.5 g/L를 넣어준 후 발효시작 5시간이 경과한 다음 4 g/L로 맞추어 주었고 글리세롤 배지를 공급하는 시점부터 12 g/L로 유지하면서 실험을 진행하였다. 이 실험의 결과 O.D. 80 정도에서 albumin 800 mg/L 정도를 얻을 수 있었다. 반면 Figure 9에서는 비성장속도를 0.1hr⁻¹로 유지하도록 O.D. 10 정도에서부터 글리세롤 배지를 공급하고 O.D. 30 이후 급작스럽게 글리세롤 공급을 중단한 후 메탄올만을 공급하면서 메탄올을 12 g/L로 유지하였다. 이때 albumin 발현 수준을 살펴본 결과 O.D. 80에서 약 300 mg/L의 albumin을 얻을 수 있었다.

이 결과로 미루어 볼 때 *P. pastoris*의 경우는 글리세롤만으로 균주를 원하는 O.D. 까지 자라게 한후 바로 메탄올로 교체하여도 albumin 발현에는 문제가 없었던 반면 *H. polymorpha*의 fed-batch 방법을 이용한 고농도 세포 배양시에는 *P. pastoris*와는 다르게 비성장속도 제어를 통하여 글리세롤 공급상태로부터 메탄올 공급으로의 전환 방법이 균주의 albumin 발현량에 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. Table 1과 2에 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*를 이용한 여러 가지 fed batch 방법과 플라스크에서의 각각에 대한 specific expression rate를 비교한 결과를 보였는데 글리세롤에서 메탄올 배지로의 전환방법에 따라 specific albumin expression

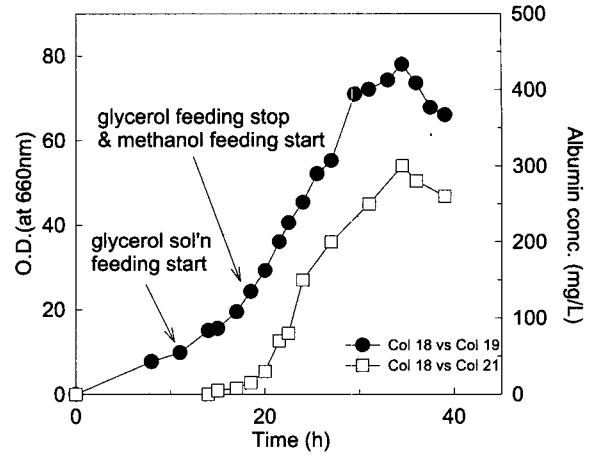


Figure 8. Two stage fed-batch fermentation profile of *H. polymorpha* (abrupt change feeding) Glycerol was fed to be maintained at $\mu=0.1$ hr⁻¹ between 11 and 18 hrs. After 18 hrs, only methanol was fed to be maintain at 8 g/L.

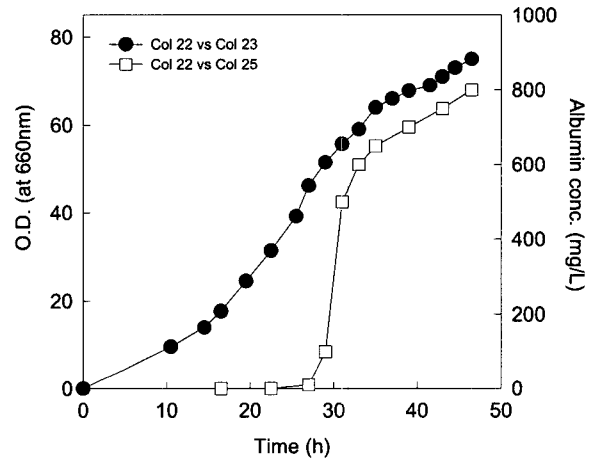


Figure 9. Two stage fed-batch fermentation profile of *H. polymorpha* (gradual change feeding) μ was stepwisely changed from 0.1 through 0.08, 0.06, 0.04 to 0.02 hr⁻¹. After 30 hrs, only methanol was fed.

Table 1. The effect of induction methods on specific albumin expression rate in fed-batch fermentation by *Pichia pastoris*

	flask	abrupt feeding change	gradual feeding change	mixed feeding
specific albumin expression rate (mg?L.hr.O.D.)	1.23	1.4	1.35	0.6
specific methanol consumption rate (g/L.hr.O.D.)	0.013	0.015	0.017	0.008

Table 2. The effect of induction methods on specific albumin expression rate in fed-batch fermentation by *Hansenula polymorpha*

	flask	abrupt feeding change	gradual feeding change
specific albumin expression rate (mg/L.hr.O.D)	0.32	0.36	0.8
specific methanol consumption rate (g/L.hr.O.D.)	0.04	0.08	0.16

Table 3. The effect of methanol feeding rate on the specific albumin expression rate in *Hansenula polymorpha*

Methanol feeding rate (% of maximum methanol uptake rate)	30%	60%	80%	100%
Specific albumin expression rate (mg albumin/L · hr · O.D.)	0.56	0.65	0.72	0.8

rate가 큰 차이가 있음을 알 수 있다. *P. pastoris*의 경우 앞서 설명한 바와 같이 글리세롤에서 메탄올 배지로의 전환 방법에 관계없이 specific albumin expression rate도 약 1.4 mg albumin/L · hr · O.D.로 비슷하였다. *H. polymorpha*의 경우에는 글리세롤에서 메탄올 배지로의 전환방법에 따라 큰 차이를 보임을 알 수 있었는데 글리세롤에서 메탄올로 단계적 전환 경우 specific albumin expression rate가 0.8 mg albumin/L · hr · O.D.를 보이는 반면 글리세롤에서 메탄올로 급작스럽게 전환한 경우는 단계적 전환경우의 50 %에도 못 미치는 약 0.36 mg albumin/L · hr · O.D.이었다.

또한 Table 3에는 *H. polymorpha*에 대하여 메탄올의 공급량을 달리하여 실험했을때의 specific albumin expression rate가 보여지는데 maximum methanol uptake rate의 30 %, 60 %, 80 %, 100 %를 feeding한 경우를 각각 비교하였다. 실험의 결과 메탄올을 maximum uptake rate의 100 %로 feeding한 경우 specific albumin expression rate가 0.8 mg albumin/L · hr · O.D.로 나타났고 30 %, 60 %, 80 %의 경우가 각각 0.56, 0.65, 0.72 mg albumin/L · hr · O.D. 이었다. 이 경우 메탄올을 maximum uptake rate의 60 %만 feeding 하여도 최대치의 약 80 %정도를 보였다. 이 실험의 결과 *H. polymorpha*를 이용한 fed batch 실험시 메탄올을 maximum uptake rate의 60 %이상 feeding해도 MOX promoter의 induction이 충분히 이루어지고 또한 albumin 생성량 감소나 dilution에 의한 발효시간의 증가등을 막을 수 있다고 생각되어진다.

제조합 알부민 발현을 위한 고농도 세포배양

앞의 실험을 통하여 탐색된 최적 fed batch 방법을 바탕으로 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*를 이용하여 높은 수준의 제조합 알부민 생산을 위한 고농도 세포 배양 실험을 수행하였다. *P. pastoris*의 경우는 pH 5.5, 온도 30 °C, 2 L배지에 종배양액을 5 %되도록 접종하였다. 글리세롤 배지를 공급하여 O.D. 150정도까지 자라게 한 후 글리세롤의 공급을 중지하고 메탄올로 전환하여 주었다. 이 실험의 결과가 Figure 10에 보여지는데 약 9.5 g/L의 알부민을 발현하였다. 또한 *H. polymorpha*의 경우는 pH 5.5, 온도 37 °C, 2L 배지에 종배양액을 5 %되도록 접종하였다. 글리세롤 배지를 공급하는 동안 비성장속도를 0.1 hr⁻¹로 유지시키면서 O.D. 250 정도까지 자라게 한 후 O.D. 250 이후 비성장속도를 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 hr⁻¹로 점차 낮추어 주면서 O.D. 300까지 자라게 하고 메탄올만으로 바꾸어 주었다. 이 때 메탄올은 위에서 언급한 방법에 따라 접종시 0.5 g/L, 발효시작 5시간이 경과한 다음 4 g/L, 글리세롤 배지를 공급하는 시점부터 12 g/L로 유지하여 실험을 진행하였다. 그 결과로 Figure 11에서 보여지는 것과

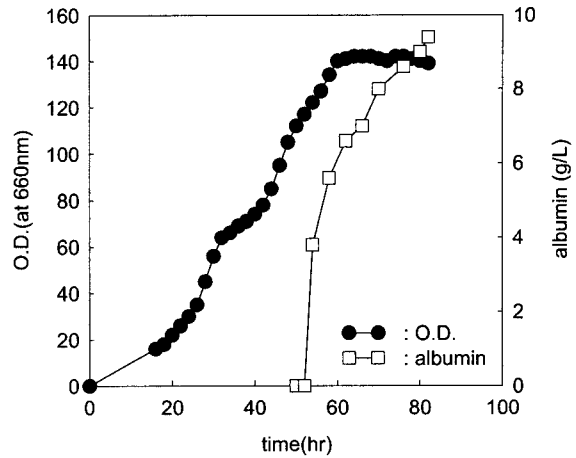


Figure 10. Profile of high cell density fermentation of *P. pastoris* Between 15 and 48 hrs. glycerol was fed to be maintained $\mu=0.1 \text{ hr}^{-1}$. After 48 hrs, only methanol was fed to be maintain at 8 g/L.

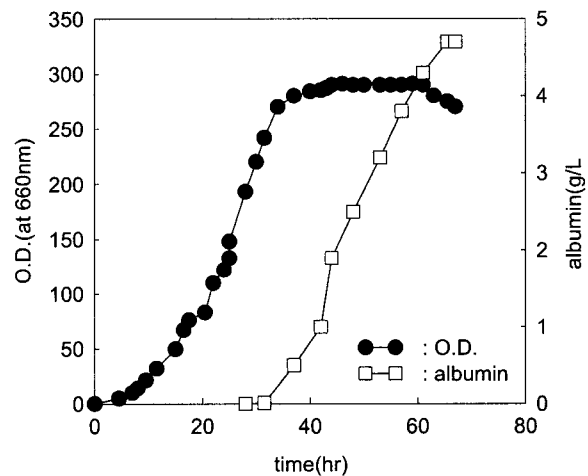


Figure 11. Profile of high cell density fermentation in *H. polymorpha* Between 15 and 40 hrs, glycerol was fed that μ can be stepwisely changed from 0.1 through 0.08, 0.05 to 0.02 hr⁻¹ After 40 hrs, only methanol was fed.

같이 O.D. 300에서 약 4.7 g albumin/L를 발현하였다. 두 경우에 있어서 발현된 제조합 알부민의 양은 상업화에 충분히 이용가능한 수준이라 생각된다.

요 약

본 연구에서는 다른 host cell에 비하여 여러 가지 장점을 가지고 있는 Methylophilic yeast중 *Pichia pastoris*와 *Hansenula polymorpha*의 fed batch 실험을 통하여 유전자 제조합 단백질 발현최적조건을 구하여 각 균주의 유전자 제조합 albumin 발현 최적화 연구를 수행하였다. 글리세롤이 두 균주의 promoter인 AOX 1과 MOX promoter repression에 미치는 영향을 확인한 바 *H. polymorpha*가 *P. pastoris*보다 promoter repression이 심함을 알 수 있었다. 두 균주의 promoter를 induction시키는 최적 메탄올 농도는 *P. pastoris*의 경우 메탄올 8g/L, *H. polymorpha*의 경우는 13 g/L임을 알 수 있었다. 또한 메탄올에 의한 induction시기는 두 균주 모

두 O. D. 4정도되는 exponential growth stage에서 메탄올을 첨가하는 경우가 초기 세포 성장단계에 메탄올을 첨가한 경우에 비해 약 20% 정도 높아짐을 확인하였다. 두 균주의 재조합 albumin 발현에 미치는 pH의 영향을 조사하였는데, *P. pastoris*의 경우 pH 5에서 가장 높은 albumin 생산성을 보여 약 300mg/L albumin을 발현하였고 *H. polymorpha*의 경우 pH 5와 6에서 최대 약 180 mg/L의 albumin을 발현하였지만 pH 8에서는 이의 절반 수준에 그쳤다. 두 균주의 최적 fed-batch방법을 확인하는 실험을 수행하였는데 *P. pastoris*의 경우의 최적 fed-batch 방법은 mixed feeding은 바람직하지 않고 글리세롤 배지를 공급하여 세포를 성장시킨 후 글리세롤 공급을 멈추고 바로 메탄올로 전환하는 방법을 효과적이며 *H. polymorpha*의 경우 비성장속도 제어를 통한 글리세롤 공급으로부터 메탄올 공급으로의 단계적 전환방법이 균주의 albumin 발현에 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 이 방법을 통하여 두 균주의 고농도 배양 실험을 수행한 결과 *P. pastoris*의 경우는 O.D. 150에서 약 9.5g/L, *H. polymorpha*의 경우는 O.D. 300에서 약 4.7g albumin/L를 발현하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 산업체에서 methylotrophic yeast를 이용한 상업화를 계획함에 있어서 host로서의 균주를 선택할 수 있는 기본 자료를 제공함과 아울러 균주가 선택된 후에 그 균주를 이용한 재조합 단백질 최적화 방법을 제공하여 줄 것으로 생각된다.

감 사

본 연구는 1999년도 특정기술개발사업(교육부)에 의하여 연구되었으며 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

1. Cregg, J.M., and K.R. Madden (1988), Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins, *Dev. Ind. Microbiol.*, **29**, 33-37.
2. Schekman, R., and P. Novick (1981), The secretory process and yeast cell-surface assembly, *In: The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression*, Cold Spring Harbor Laboratory, 361-367.
3. Schekman, R.(1985), Protein localization and membrane traffic in yeast *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**, 115-122
4. Cregg J.M., J.F. Tschopp, C. Stillman (1987), High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastiros*, *Bio/Technology*, **5**, 497-503.
5. Cregg J.M., K. Hessler (1985), *Pichia pastoris* as a host system for transformation, *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3376-3383.
6. Cregg, J.M., and C.R. William (1993), Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Biotechnology*, **11**, 905-913.
7. Grinna, L. S. and J.F. Tschlopp (1989), Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Yeast*, **5**, 107-112.
8. Gellissen G., Z.A. Janowicz and C.P. Hollenberg (1992), Heterologous protein production in yeast, *Biotech. Adv.*, **10**, 179-181.
9. Gellissen G. and C.P. Hollenberg (1995), Gene expression in methylotrophic yeasts, Marcel dekker, Inc.