

GAL promoter에 적합한 효모변이주 Y334를 이용한 재조합 단백질 생산 최적화 방법 개발

*강 환 구 · 전 희 진 · 이 문 원
한남대학교 공과대학 화학공학과, ¹(주)셀 바이오 테크 발효팀
(접수 : 2000. 4. 7., 게재승인 : 2000. 4. 22.)

The Optimization of Recombinant Protein Production using *S. cerevisiae* Mutant Y334 Suitable for GAL Promoter

Whankoo Kang*, Heejin Chun, and Moonwon Lee¹
Department of Chemical Engineering, Hannam University, Taejeon, Korea
¹Fermentation team, Cell Biotech Co., Ltd., Kyongki-Do, Korea,
(Received : 2000. 4. 7., Accepted : 2000. 4. 22.)

The production of heterologous protein using GAL promoter in conventional *S. cerevisiae* has several problems to solve for commercialization. In this research, *S. cerevisiae* mutant(reg1-501, gal1), which cannot use galactose and has alleviated glucose repression level, is used as host for optimizing induction of GAL promoter. In this experiment, the effects of specific growth rate on specific recombinant protein expression rate were tested in both cases and optimum fed batch fermentation method was obtained in both cases. Through these experiments, optimum condition of recombinant protein production by GAL promoter using *S. cerevisiae* mutant (reg1-501, gal1) were found.

Key Words : *S. cerevisiae*, recombinant protein, albumin

서 론

Human Serum Albumin(HSA)은 혈액으로부터 plasma를 분획하거나 또는 인체 태반으로부터 얻고 있으나, 원료제공자의 부족으로 원재료 공급부족현상을 보이고 있으며 병원균의 오염에 의한 안전성 문제가 심각하게 대두되고 있어 유전자 재조합 기술에 의한 HSA의 대량생산이 필연적이다. 세계적으로는 이미 수 g/L의 생산수율을 확보하고(1,2) 발효 및 정제공정, 그리고 임상실험을 진행하는등 머지않아 유전자 재조합에 의한 HSA의 제품화를 예고하고 있다. 최근에는 고부가가치 단백질을 생물공학기술을 통하여 생산하는 사례가 많아지는 상황이므로, 기존의 발현체계와 발효공정기술을 개선할 수 있는 기술을 개발하는 것은 의약 분야뿐만 아니라, 산업기술전반에 걸쳐 막대한 영향을 끼칠 수 있다고 생각된다.

현재 유전자재조합 단백질 생산을 위해 주로 쓰이고 있는

host로는 *E. coli*와 *S. cerevisiae* 등의 yeast 그리고 동물세포인 CHO cell 들이 있으며 이들 중 Yeast는 *E. coli*와 비교하여 몇 가지 장점을 가지고 있다(3). 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(4) 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.

*S. cerevisiae*에 이용되어지는 promoter는(5) 여러 가지가 있는데(6,7,8,9,10) 그 중 보편적으로 이용되는 GAL promoter는 글루코스가 고갈된 상태에서 갈락토즈에 의해 induction되어지는 유도성(inducible) 프로모터로서 균체중식과 유전자 발현을 분리하여 조절하여(11) 높은 발현율을 가지는 regulated promoter이나 이를 사용하는 경우는 다음과 같은 문제점이 있는 것으로 보고된다(12). 첫째, GAL promoter는 글루코스가 완전히 고갈된 상태에서 갈락토즈에 의해 induction 되어

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

지므로(13,14) 갈락토즈만의 존재 하에서는 균주의 성장이 둔화되어지며 또한 글루코즈가 완전히 고갈되어야하므로, *S. cerevisiae*의 여러 protease가 글루코즈에 의해 repression되는 점을 감안할 때 이러한 글루코즈 고갈 조건에서 protease에 의한 생성 단백질 분해 문제가 발생하게 되어진다. 둘째, GAL promoter의 inducer인 갈락토즈는 매우 비싼 탄소원인데 일반적으로 GAL promoter에 이용하는 *S. cerevisiae*는 갈락토즈를 이용하게 되어 cell이 자라게 됨에 따라 배지중의 갈락토즈 농도가 계속 낮아지게 되는데 GAL promoter의 strength가 배지중의 갈락토즈 농도에 관계되어짐을 생각할 때 이렇게 발효중에 탄소원으로 이용되어 낮아지는 갈락토즈 level은 낮은 발현율을 유발하게 되어진다.

이러한 문제점을 해결하기 위해서 본 연구에서는 GAL promoter의 glucose repression이 줄어들도록 reg1-501 mutation이 되었으며 갈락토즈 이용의 단계중 첫번째로 작용하는 galactokinase효소가 결손 되도록 gal1 mutation이 되어 갈락토즈를 이용하지 못하고 낮은 갈락토즈 농도에서도 높은 발현율을 보이는 *S. cerevisiae*변이주를 이용하여 GAL promoter로부터의 fed-batch를 통한 생산 최적화 연구를 수행하였다.

재료 및 실험방법

사용균주

본 연구에 사용한 *S. cerevisiae* mutant는 Y334 (MAT α pep4-3 prb1-1122 ura3-52 leu2-3,112 reg1-501 gal1)로서 reg1-501 mutation에 의해 glucose repression을 적게 받는 균주이며 gal1 mutant로서 갈락토즈의 사용단계의 첫 번째 이용되는 galactokinase효소가 결손되어 갈락토즈를 거의 사용하지 못하게 되는 strain이다. 또한 대조군으로 쓴 *S. cerevisiae*는 Y2805 (MAT α pep::HIS3 prb- Δ 1.6R can1 his3-20 ura3-52)로서 일반적으로 GAL promoter의 host로 쓰이는 *S. cerevisiae*이며 이들 strain에 GAL promoter를 가진 human serum albumin gene을 포함하는 vector를 집어넣어 사용하였다. 이들 Y334 mutant와 Y2805는 생명공학연구소 이상기 박사팀으로부터 받아 사용하였다.

배지 및 배양방법

본 실험에 사용된 배지는 YD(Yeast Extract 20 g/L, glucose 20 g/L) 배지이며 실험조건에 따라 갈락토즈를 첨가하게 되고 질소원으로 필요에 따라 펩톤등이 사용되어지게 된다. 전배양은 yeast nitrogen base without amino acid (YNB) 0.67 g/L, amino acid solution(adenine 0.2 g/L, tryptophane 0.1 g/L, tyrosine 1.5 g/L, lysine 0.15 g/L, phenylalanine 0.25 g/L, threonine 2 g/L, histidine 1 g/L, leucine 1 g/L) 40 mL/L, 글루코즈 20 g/L가 포함된 minimal media를 사용하여 250rpm, 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 사용하였다. 기초 실험을 위한 플라스크 배양은 500 mL baffled flask의 100 mL 배지에 전배양 용액을 1% 접종한 후 250 rpm의 진탕배양기에서 수행했다. 또한 발효기를 이용한 batch실험은 글루코즈 20 g/L, 효모추출물(YE) 20 g/L, 갈락토즈 30 g/L 조성의 배지에 전배양용액을 10 % 접종하였고 30 ℃, 800 rpm, pH 5.5의 조건으로 배양하였다. 갈락토즈 농도에 대한 실험은 발효기에서 일정농도로 유지하

Table 1. *S. cerevisiae*의 Fed-batch실험을 위한 배지조성.

배지성분	농도
A. Batch	
glucose	5 g/L
yeast extract	25 g/L
KH_2PO_4	13.5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	3.8 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/L
Thiamine	0.004 g/L
Inositol	0.02 g/L
Trace-metal solution ^a	3 mL/L
Vitamin solution ^b	3 mL/L
B. Feeding	
glucose	exp. st. ^c :213 g/L, grw. st. ^d :500 g/L
yeast extract	exp. st.:280 g/L, grw. st.:250 g/L
galactose	exp. st.:320 g/L
KH_2PO_4	2.9 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	5 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.8 g/L
Thiamine	0.01 g/L
Inositol	0.07 g/L
Trace-metal solution ^a	6.8 mL/L
Vitamine solution ^b	6.8 mL/L

^aTrace-metal solution:FeCl₂ · 6H₂O 27 g/L, ZnCl₂ · 4H₂O 2 g/L,CaCl₂ · 6H₂O 2 g/L, NaMoO₄ · 2H₂O 2 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 1 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.19 g/L, H₃BO₃ 0.5 g/L:concentrated HCl 0.1 g/L

^bVitamin solution:pantothenic acid 0.42 g/L,niacin 5.4 g/L, pyridoxine 6.1 g/L, biotin 1.4 g/L, folic acid 0.04 g/L

^cexp. st. : expression stage ^dgrw. st. : growth stage

면서 수행하였다. Fed-batch 실험에는 Table 1과 같은 조성의 배지를 사용하였으며 30 ℃, DO 10 % 이상 유지, pH 5.5, 800~1000 rpm 조건으로 배양하였고 모든 pH control은 2 N HCl용액과 2 N NaOH용액으로 조절하였다.

분석방법

실험중 세포의 농도는 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 600 nm에서의 O.D.(optical density)를 분광흡도계를 사용하여 측정하였고, 배양액 중의 포도당 농도는 글루코즈 분석 키트(glucopat, Kagaku)를 이용하여 분석하였다. 배지 중의 갈락토즈의 양은 modified DNS 방법을 사용하여 측정하였다(15). DNS용액은 0.25 g 3,5-dinitrosalicylic acid, 75 g sodium potassium tartarate (Rochelle salt)를 50 mL의 2 M NaOH용액에 녹인 후 다시 물로 희석하여 최종부피 250 mL로 만들어서 사용하였다. 배양액의 상등액을 갈락토즈 농도가 1 g/l 이하가 되도록 희석한 시료 1 mL에 DNS용액 1 mL를 넣고 100 ℃에서 5분간 반응시킨 후 찬물에서 급속히 냉각하여 반응을 정지시킨 다음 550 nm에서의 흡광도를 측정하고 이 값을 미리 구한 검량선과 비교하여 갈락토즈의 양을 계산하였다. 목적 단백질인 albumin은 분비 형태로 발현

되며 생성된 albumin의 양은 SDS PAGE/silver, coomassie staining 및 western blotting 방법에 의하여 알고 있는 양의 albumin standard와 비교하여 정량 하였고 이때 12 % gel을 사용하여 67KD band에 대해 분석하였다. 배지중 에탄올 분석은 Gas Chromatograph (Donam, DS 6200)에서 수행되었다. 사용된 G.C. column은 길이 6ft의 녹슬지 않는 stainless steel 이고 충전물질은 Hayesep Q(CRS)이며 불꽃이온화 검출기 (FID)를 이용하였다. carrier gas는 헬륨을 사용하였으며 실험조건은 주입부 180 °C, 오븐은 130 °C, 검출부는 200 °C이었다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 GAL promoter의 glucose repression이 줄어들도록 reg1-501 mutation이 되어 갈락토즈 이용의 단계중 첫 번째로 작용하는 galactokinase효소가 결손 되도록 gal1 mutation이 되어 갈락토즈를 이용하지 못하고 낮은 갈락토즈 농도에서도 높은 발현율을 보이는 *S. cerevisiae* 변이주 Y334와 대조구 Y2805를 batch 및 fed-batch실험을 통하여 비교함으로써 이들 strain에 있어서 GAL promoter로부터의 발현 최적화 연구를 수행하였다.

효모 변이주 Y334와 대조구 Y2805에서의 GAL promoter의 glucose repression 정도 비교

이 실험에서는 2% 글루코즈, 2% YE 그리고 3% 갈락토즈를 배지로 사용하였으며 갈락토즈의 농도는 실험중 3%수준을 유지하였으며 30 °C, 800 rpm, pH 5.5에서 실험을 수행하였고 이 때의 glucose repression 결과가 Figure 1에 보여진다. mutant인 Y334의 경우에는 글루코즈가 0.5 g/L의 농도로 존재할 때에도 최대발현량의 25 % 정도가 발현되는 것으로 보이며 글루코즈가 고갈되는 시점에서는 최대 발현량의 약 65%가 되어지는 것을 알 수 있었다. 반면 대조구인 Y2805의 경우에는 배지중 글루코즈가 남아있을 때에는 albumin이 전

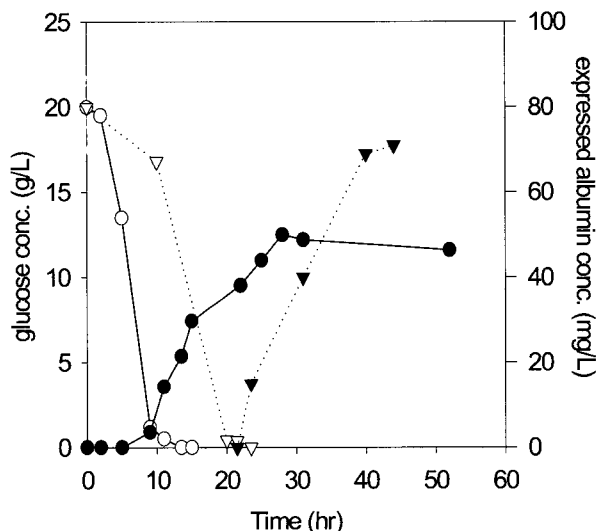


Figure 1 The extent of glucose repression on albumin expression with *S. cerevisiae*.
 ○—○ : glucose conc.(Y334), ▽...▽ : glucose conc.(Y2805), ●—● : albumin conc. (Y334), ▽...▽ : albumin conc. (Y2805)

혀 발현되지 않았고 또한 글루코즈가 완전히 소비된 뒤에도 약 2~3시간 후에 발현이 시작되는 것을 알 수 있었다. 이 결과 대조구 Y2805에 비해서 mutant인 Y334에 있어서는 GAL promoter에 미치는 glucose repression 정도가 매우 적음을 알 수 있었다. 이와 같은 것은 Y334의 경우 reg1-501돌연변이에 의하여 glucose repression이 줄어들음에 기인하였으며 이와 같은 특성은 향후 fed-batch시의 feeding 방법개발에장점으로 적용될 수 있을 것이다.

변이주 Y334와 대조구 효모 Y2805의 Plasmid stability

배양 중 재조합 미생물인 두 균주 변이주 Y334와 대조구 효모 Y2805의 대규모 발효조에서의 대량생산시 plasmid의 안정성문제에 기인한 plasmid 감소에 의하여 외래 단백질 생산성 감소가 예상되어 plasmid stability에 대해 조사하였다. plasmid stability는 각 시간에 따라 채취한 배양액을 petri dish의 complex agar 배지위에 약 150~200 colony 정도가 생기도록 희석하여 도말한 후 약 24시간 동안 30 °C의 항온 배양기에서 배양한 후, 이 때 나타나는 colony를 글루코즈 10 g/L, 효모추출물 10 g/L, 한천 15 g/L의 조성을 가진 complex agar 배지와 글루코즈 10 g/L, yeast nitrogen without amino acid(YNB) 0.67 g/L, amino acid solution 40 mL/L의 조성인 selective agar media에 각각 전이시킨 후 다시 30°C의 항온 배양기에 배양하여 생기는 colony 개수의 비율을 plasmid stability로 표현하였다. 이 실험의 결과를 Figure 2, 3에 나타내었다. 보이는 바와 같이 mutant Y334의 경우 generation number가 13에 이를때까지 plasmid stability는 거의 95%로 유지되어 매우 안정한 균주임을 알 수 있었으며 대조구 Y2805의 경우도 plasmid stability는 90%로 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 mutant Y334를 사용하는 경우 plasmid stability 문제점은 없는 것으로 확인되었다. 특히 GAL 프로모터는 다른 프로모터에 비해 모두 높은 plasmid 안정성을 보이는 것으로 알려져 있다(16).

GAL promoter로부터 일부인 발현을 및 세포성장에 미치는 갈락토즈 농도의 영향

배지성분은 2 % 글루코즈와 2 % 효모추출물(YE)이었으며 갈락토즈 농도는 각각 0.01 %, 0.5 %, 3 % 이었고 발효기에

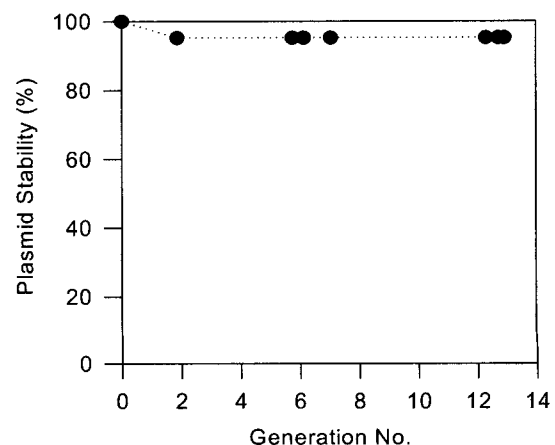


Figure 2. Plasmid Stability with *S. cerevisiae* mutant Y334.

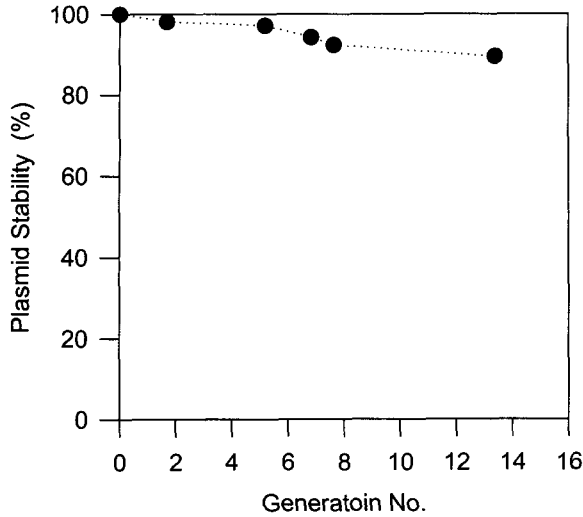


Figure 3. Plasmid Stability with *S. cerevisiae* conventional host Y2805.

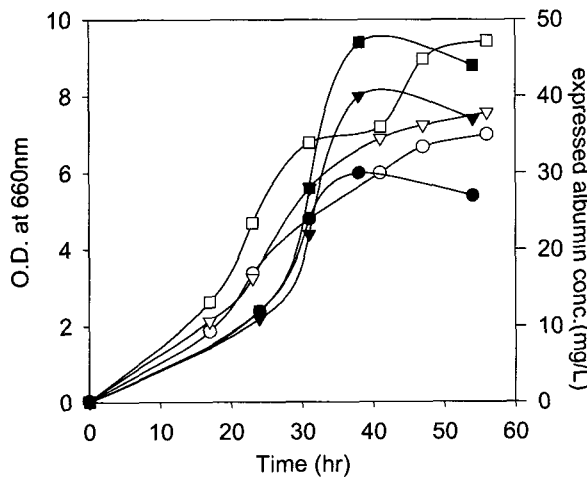


Figure 4. The effect of galactose concentration on cell growth and albumin expression level with *S. cerevisiae* mutant Y334.

○—○ : O.D. - 0.01% galactose, ▽—▽ : O.D. - 0.5% galactose, □—□ : O.D. - 3% galactose, ●—● : albumin - 0.01% galactose, ▼—▼ : albumin - 0.5% galactose, ■—■ : albumin - 3% galactose

서 30 °C, 800 rpm, pH 5.5의 조건으로 수행되었다. 이 결과가 Figure 4, 5에 보여진다. mutant Y334의 경우에는 갈락토즈 농도가 증가함에 따라 최종세포농도가 낮아짐이 관측되었는데 이는 높은 갈락토즈 농도에 의한 growth inhibition으로 생각되어지며 albumin 발현량의 경우는 갈락토즈 농도 1, 2, 3% 에서 거의 비슷하게 최대 약 50 mg/L의 albumin을 생성하였고 galactose 농도가 낮아져도 albumin의 발현량이 많이 감소하지 않아 갈락토즈 0.01%에서 최대 발현량의 약 60%에 이르는 약 30 mg/L의 albumin을 생성하였다. 이 이유는 mutant Y334의 경우는 거의 갈락토즈를 사용하지 않으므로 세포안의 갈락토즈 농도 pool이 상대적으로 Y2805에 비해 높게 유지되는 것으로 생각되며 그 결과 낮은 갈락토즈 농도에서도 높은 발현율을 나타내는 것으로 보여진다. 그러나 대조구 Y2805에 있어서는 갈락토즈 농도가 증가될수록 세포최종농도도 증가함을 알 수 있었고 albumin 발현의 경우

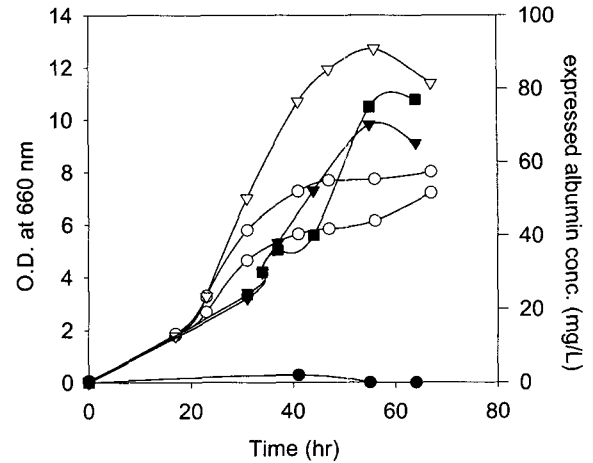


Figure 5. The effect of galactose concentration on cell growth and albumin expression level with *S. cerevisiae* mutant Y2805.

○—○ : O.D. - 0.01% galactose, ▽—▽ : O.D. - 0.5% galactose, □—□ : O.D. - 3% galactose, ●—● : albumin - 0.01% galactose, ▼—▼ : albumin - 0.5% galactose, ■—■ : albumin - 3% galactose

에 있어서도 갈락토즈 농도 3%에서 약 80 mg/L의 최대발현량을 보였고 갈락토즈 농도가 0.01%에서는 albumin이 전혀 발현되지 않음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 두 균주에 이용되어지는 GAL promoter의 inducer인 갈락토즈는 매우 비싼 탄소원인데 대조구 Y2805의 경우 갈락토즈를 이용하여 cell이 자라게 됨에 따라 배지중의 갈락토즈 농도가 계속 낮아지게 되고 albumin의 발현량이 갈락토즈 농도에 관계되어짐을 생각할 때 배지중 많은 양의 갈락토즈가 필요하게 되는 반면 mutant Y334의 초기에 낮은 수준의 갈락토즈를 첨가하고 발효중 갈락토즈가 소비되지 않음으로 더 이상의 갈락토즈 첨가는 필요하지 않다. 이를 고려할 때 두 균주를 이용하여 상업적으로 albumin을 생산할 때 배지 원가에도 상당한 영향을 미칠것으로 생각된다.

생성된 albumin의 분해에 미치는 pH 영향

배지의 pH가 albumin 발현에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 배지 조성은 글루코즈 2 %, 효모추출물(YE) 2 %, 갈락토즈 2%이었고 실험조건은 30 °C, 250 rpm이었다. 이 결과가 Figure 6에 보여진다. Y2805의 경우 pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5등에서 실험을 수행한 결과 pH 5.5에서 80 mg/L로서 최대 발현량을 보였고 분해현상도 작은 것으로 확인되었다. pH 3.5에서는 발효 후 배지중의 albumin양은 10 mg/L로서 최대치에 비해 매우 적음을 알 수 있다. 또한 Y334의 albumin 발현에 관한 최적 pH를 조사하였는데 O.D.의 경우는 각 pH에서 큰 차이를 보이지 않았으나 albumin생산의 경우 Y2805의 경우와 마찬가지로 pH5.5에서 약 50 mg albumin/L로서 최대가 됨을 알 수 있었다. 이 실험의 결과 Y2805, Y334 모두에서 pH가 albumin 생산성 향상에 매우 중요한 인자임을 알 수 있었다.

글루코즈, 갈락토즈, 에탄올의 소비속도 측정

Y2805와 Y334의 경우에 글루코즈, 갈락토즈, 에탄올의 소비속도를 측정하여 이를 Figure 7, 8 그리고 Table 2에 나타내었는데 mutant Y334의 경우는 갈락토즈의 소비속도가 때

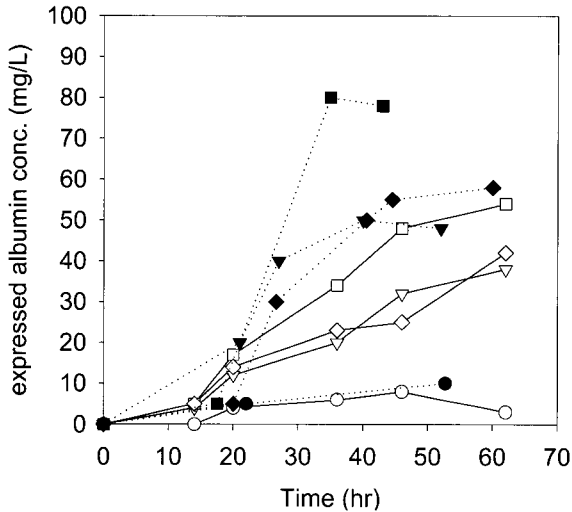


Figure 6. The effect of pH on albumin expression level with *S. cerevisiae*.

○—○ : pH 3.5 - Y334, ▽—▽ : pH 4.5 - Y334, □—□ : pH 5.5 - Y334, ◇—◇ : pH 6.5 - Y334, ●—● : pH 3.5 - Y2805, ▼—▼ : pH 4.5 - Y2805, ■—■ : pH 5.5 - Y2805, ◆—◆ : pH 6.5 - Y2805

우 낮아 약 0.0131 g/L/O.D./hr 이었으며 글루코즈의 소비속도는 1.7519 g/L/O.D./hr 이었고 대조구 Y2805의 경우는 갈락토즈와 글루코즈의 소비속도가 각각 0.1232, 2.07 g/L/O.D./hr 임을 알 수 있었다. 이 결과를 볼 때 Y334의 갈락토즈의 소비속도는 Y2805의 1/10 이하 정도임을 알 수 있었다. 이 결과는 두 균주에 이용되어지는 GAL promoter의 inducer인 갈락토즈는 매우 비싼 탄소원인데 대조구 Y2805의 경우 갈락토즈를 이용하여 cell이 자라게 됨에 따라 배지중의 갈락토즈 농도가 계속 낮아지게 되고 albumin의 발현량이 갈락토즈 농도에 관계되어짐을 생각할 때 배지중 갈락토즈의 농도를 일정수준 이상으로 유지하기 위해서는 많은 양의 갈락토즈가 필요하게 되어지는 반면 mutant Y334의 초기에 낮은 수준의 갈락토즈를 첨가하고 발효중 갈락토즈가 소비되지 않으므로 더 이상의 갈락토즈 첨가는 필요하지 않음을 고려할 때 두 균주를 이용하여 상업적으로 albumin을 생산할 때 배지 원가에도 상당한 영향을 미칠것으로 생각된다. 이 이유로는 fed-batch의 경우 바람직한 feeding 방법은 글루코즈와 갈락토즈를 적절한 비율로 섞어 feeding 하여 cell의 성장에 더 도움이 되는 글루코즈가 먼저 소비되고 동시에 갈락토즈를 소비하며 목적 외래단백질을 발현하는 방법인데 이 경우 장점으로 글루코즈가 완전히 고갈되어 생길 수 있는 protease에 의한 생성단백질 분해 문제를 해결할 수 있음에 있다. 그러나 글루코즈의 repression을 심하게 받을 경우에는 이러한 글루코즈와 갈락토즈의 mixed feeding을 이용함이 어렵게 된다. 이는 글루코즈의 repression이 tight한 경우에는 좋은 carbon substrate인 글루코즈를 이용한 fed batch에서의 비성장속도 제어 feeding을 하기 어렵다는 점과 글루코즈가 완전히 고갈되어 질 때는 protease에 의한 생성단백질 분해 문제가 발생함에 그 이유가 있는데 본 실험에서 test한 mutant Y334는 GAL promoter에 미치는 glucose repression 정도가 매우 적은 장점을 지닌 점이 확인되었으며 이는 fed-batch 실험을 통하여 적용되어질 수 있었다.

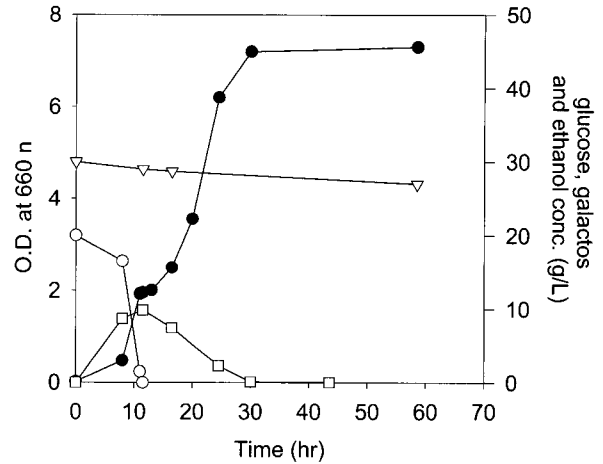


Figure 7. The fermentation profile of *S. cerevisiae* mutant Y334.

●—● : O.D., ○—○ : glucose conc, ▽—▽ : galactose conc, □—□ : ethanol conc

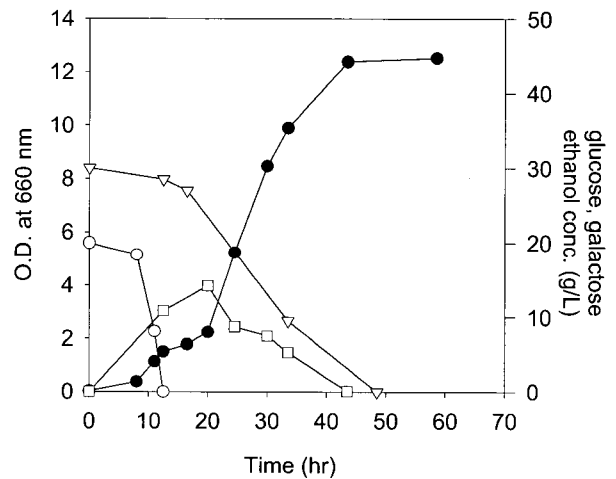


Figure 8. The fermentation profile of *S. cerevisiae* Y2805.

●—● : O.D., ○—○ : glucose conc., ▽—▽ : galactose conc., □—□ : ethanol conc.

Table 2. Y334와 Y2805의 글루코즈, 갈락토즈, 에탄올의 소비속도.

소비속도 (g/O.D./hr/L)	Y334	Y2805
글루코즈	1.7519	2.0793
갈락토즈	0.0131	0.1232
에탄올	0.1417	0.1087

변이주 Y334와 대조구 Y2805의 Fed-batch

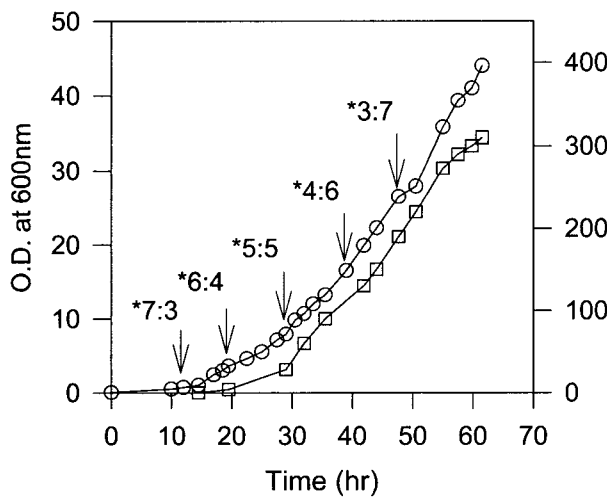
mutant Y334 와 대조구 효모 Y2805의 Fed-batch시의 올바른 feeding 방법을 구하기위한 실험을 수행하였는바 먼저 대조구 효모 Y2805의 경우에는 고농도 Fed-batch를 수행하기 위해서는 갈락토즈만을 feeding하는 것보다 알맞은 비율의 글루코즈와 갈락토즈를 섞어 feeding하는 것이 albumin발현 및 세포 성장에 도움을 주는 것을 확인하여 feeding solution중의 최적 글루코즈와 갈락토즈의 비를 구하는 실험을 수행하였다.

이 실험에서는 feeding 배지의 성분중 글루코스와 갈락토스의 함을 일정하게 유지하고 그 비를 변화시키는 방법으로 진행하였는바 이 결과는 Figure 9 와 Table 3에 나타나듯이 글루코스 대 갈락토스의 비가 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7로 변화될 때 Specific albumin expression rate(mg albumin/L/O.D./hr)가 0.224, 0.44, 0.737로 증가되었다가 0.446, 0.31로 감소됨을 알 수 있으므로 feeding 배지내의 최적 글루코스 대 갈락토스의 비는 5:5정도임을 알 수 있었고 그때의 최적 μ 값은 약 0.1 hr⁻¹임을 확인하였다.

또한 변이주 Y334 경우에서의 fed-batch시 최적 feeding 방법을 구하기 위하여 갈락토스농도를 일정하게 유지하도록 배지첨가에 의하여 희석되는 정도를 보상하는 양의 갈락토스를 넣어주며 (왜냐하면 변이주는 갈락토스를 거의 소비하지 않기 때문에) specific growth rate가 일정하도록 글루코스만으로 feeding을 하였으며 이때 여러 다른 specific growth rate에서의 specific albumin expression rate를 조사하였는데 이 결과는 Figure 10과 Table 4에 나타나며 μ 값이 0.144, 0.12, 0.1, 0.063, 0.057로 낮아질 때 specific albumin expression rate(mg albumin/O.D./L/hr)가 0.37, 0.59, 0.78로 높아지다가 0.4, 0.22로 낮아짐을 알 수 있었고 최대 발현을 위한 최적 μ 값은 약

Table 3. The effect of glucose to galactose ratio on albumin expression rate with *S. cerevisiae* Y2805.

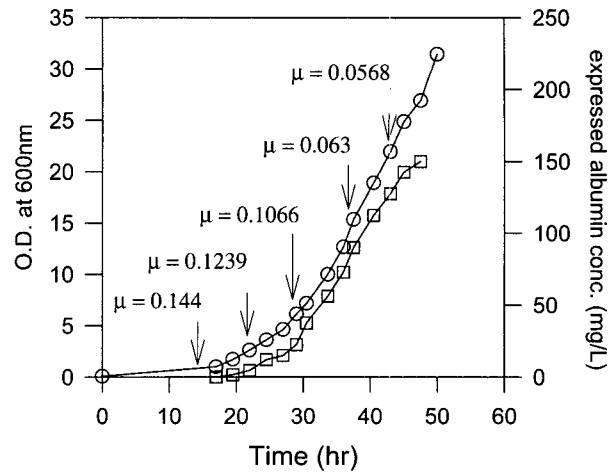
ratio of glucose to galactose in feeding mixture (specific growth rate, hr ⁻¹)	specific Albumin expression rate (mg/L · O.D. · Hr)
7 : 3 (0.1379)	0.2241
6 : 4 (0.1122)	0.4394
5 : 5 (0.1006)	0.7377
4 : 6 (0.077)	0.446
3 : 7 (0.0644)	0.31



□—□ : expressed albumin conc. (mg/L)
○—○ : O.D.

* The ratio of glucose to galactose in feeding mixture

Figure 9. Fed batch profile using *S. cerevisiae* Y2805 with feeding of mixture having different glucose to galactose ratio



□—□ : expressed albumin conc. (mg/L)
○—○ : O.D.

* To compensate the dilution effect because of feeding, galactose was intermittently fed to be maintained at 2%

Figure 10. The effect of different specific growth rate on expression and O.D. using *S.cerevisiae* mutant Y334 with feeding of glucose solution in fed batch mode.

Table 4. The effect of specific growth rate on specific albumin expression rate with *S. cerevisiae* Y334.

Specific growth rate (μ)	specific albumin expression rate mg/L · Hr · O.D.
0.144	0.3676
0.1239	0.5877
0.1066	0.7809
0.063	0.3951
0.0568	0.2186

0.11hr⁻¹임을 알 수 있었다. 이 실험의 결과로 볼 때 Y334를 이용한 고농도 세포배양을 통한 재조합 albumin 생산은 Y2805를 이용할 때에 비해 상당한 장점이 있는 것으로 보인다. Table 3과 4를 비교해 보면 Y2805의 경우 배지 feeding 시 μ 값은 Y334와 비슷하지만 글루코스와 갈락토스의 mixed feeding이므로 실제 글루코스의 공급량은 Y334에 비하여 많은 수준이다. 그럼에도 불구하고 Y334는 albumin expression rate가 비슷한 μ 값 수준에서 Y2805보다 높은 수준으로 나타난다.

이는 Y334가 glucose repression이 상대적으로 적음에 기인하는 것으로 생각되어진다. 그러므로 Y334를 이용한 고농도 세포배양은 글루코스만을 feeding하고 갈락토스는 따로 feeding 하지 않고 적절한 시점에 첨가하면 되기 때문에 작업이 간편하고 또한 비싼 탄소원인 갈락토스를 적게 소비하므로 발효원가의 절감에 상당한 영향을 미칠 것으로 생각되어지는 바 두 균주를 이용한 fed-batch시의 발효배지 원가를 계산해 보았다. 변이주 Y334와 대조구 Y2805를 이용한 실험에서 1g albumin을 생산하는데 필요한 배지 원가를 계산하였다. 이 결과 Y334를 사용하는 경우의 배지원가는 Y2805에 비해 약 1/20으로 낮아짐을 알 수 있었고 값이싼 bulk protein을 유전자 재조합 방법으로 생산하는 경우 이 mutant는 매우 중요하다고 생각되어진다.

요 약

본 연구에서 갈락토즈를 거의 이용하지 않고 glucose repression 정도가 줄어든 변이주를 이용하여 fed-batch를 통한 발현최적화를 수행하였다. 두 균주에서의 GAL promoter에 의한 외래단백질 생산시 glucose repression 정도에 대해 조사하였는데 대조구 Y2805는 글루코스가 다 소비된 후 2~3시간 지난 후 발현이 시작되나 변이주 Y334는 약 0.5 g/L 글루코스 농도에서 25% 정도의 발현이 이루어짐에 따라 변이주 Y334는 GAL promoter에 미치는 glucose repression 정도가 매우 약한 장점을 확인하였다. 배양 중 재조합 미생물인 두 균주 변이주 Y334와 대조구 효모 Y2805의 plasmid stability에 대해 조사하였다. mutant Y334의 경우 generation number가 13에 이를때까지 plasmid stability는 거의 95%로 유지되어 매우 안정한 균주임을 알 수 있었으며 대조구 Y2805의 경우도 plasmid stability는 90%로 유지됨을 알 수 있었다. GAL promoter에 의한 외래 단백질 생산시 발현을 위한 최적 갈락토즈 농도를 조사하였는데, Y2805는 3% 까지의 높은 갈락토즈 농도에서 최대 발현량을 보였으며 변이주 Y334는 높은 갈락토즈 농도에서 growth inhibition을 보였다. 두 균주를 이용하여 배지중 pH가 외래 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였는데 두 균주 모두 pH 5근처에서 최대 발현량을 보임을 알 수 있었다. GAL promoter에 의한 외래 단백질 생산시 글루코스와 갈락토즈, 에탄올의 소비속도를 조사하였는데, 글루코스와 에탄올의 소비속도는 거의 비슷하였으나 갈락토즈 소비속도는 Y2805는 0.1232 g/L/hr/O.D.이고, 변이주 Y334는 0.0131 g/L/hr/O.D. 이다. 또한 mutant Y334 와 대조구 효모 Y2805의 Fed-batch시의 올바른 feeding 방법을 구하기 위한 실험을 수행하여 각 균주의 Fed-batch실험에서의 최적 발현 방법을 획득하였다.

감 사

본 연구는 1999년 특정연구개발사업(과학기술평가원)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

1. NIKKEI BIOTECHNOLOGY Annual Report. (1995).
2. Bio/Technology Vol 9. Oct. 968-972, (1991).
3. J. Cregg, K. Hessler (1985), Mol. Cell. Biol., 5, 3376-3382.
4. M. Latta, M. Knapp, P. Sarmientos, G. Brefort (1987), BIO/TECHNOLOGY VOL 5, 1309-1045.
5. D. Sleep, G. P. Belfield and A.R. Goodey. (1990), BIO/TECHNOLOGY VOL 8. 42-47.
6. R. Hitzeman, F. Hagie (1981), Nature, 293, 717-722.
7. M. Tuite, C. Mclaughlin (1982), Mol. Cell. Biol. 2, 490-497.
8. M. Innis, M. Holland (1985), Science, 228, 21-26.
9. G. Ammerer, (1983). Methods Enzymol., 101, 192-201.
10. S. Rosenberg, P. Barr (1984), Nature, 312, 77-80.
11. J. Fieschko, K. Egan, T. Ritch, R. Koski, M. Jones, G. (1987), Bitter, Biotec/Bioeng, 29, 1113-11118,
12. P. Hovland, J. Flick, M. Johnston, and R. A. (1989), Sclafan1. Gene, 83, 57-64.
13. M. Johnston (1987), Microbiol Rev, 51,458-462,
14. L. Mylin, K. Hofmann, L. Schultz, J. Hopper (1990), Methods Enzymol, 185, 297-303,
15. M. chaplin, Carbohydrates analysis : a practical approach (1986), IRL press, Oxford, Washington DC., p3
16. S. Nam, H. Lim, B. Chung, Y. Chang (1996), Korean J. Biotechnol. Bioeng., 11(4). 445-452,