

Effect of methanol feed rate on the production of saxatilin  
by recombinant *Pichia pastoris*

민철기, 박홍우, 정광희

한양대학교 화학공학과 생물공학연구실, 연세대학교 심혈관연구소

전화 (02)2290-0487, fax (02)2299-9496

**abstract**

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is one of the best host for the production of foreign proteins because of the presence of the strong AOX1 promoter induced by methanol. Methanol feeding induces the protein production and provides energy sources for the host cells. However, excess methanol inhibits the growth of host cells, while an insufficient methanol lead to poor growth and protein production. We have used various controlled methanol feeding strategies to obtain the maximum proteins.

**서론**

*Pichia pastoris*는 메탄올 자화효모로써 엄격하게 조절되는 alcohol oxidase(AOX1) promoter를 가지고 있으며 메탄올의 첨가시 단백질이 발현되기 시작한다.<sup>1)</sup> 1985년 이후 효소, 항원, 항체, 성장호르몬등 많은 외래 단백질이 *Pichia* system을 통하여 생산되기 시작하였다.<sup>2)</sup> *Pichia*의 발효공정에서 메탄올 공급속도는 세포의 성장속도와 상당히 밀접한 관계를 가지고 있으며 세포의 성장은 또한 단백질의 발현속도와 발현량에 연관이 되어있다. 1995년 이후 대부분의 *Pichia* 발효공정에서 메탄올 공급 방식은 step increase방식에 따르고 있다. Katakula Y. 등은<sup>4)</sup> semiconductor gas sensor를 사용하여 human  $\beta_2$ -glycoprotein I domain V를 생산하는데 methanol 농도를 최적화 하였으며 Guarna M.M 등은<sup>5)</sup> 메탄올 농도를 0.3%(v/v)로 유지 했을때 가장 좋은 생산성이 나타남을 보고했다. 그러나 methanol의 소비속도는 세포가 성장하면서 증가하기 때문에 배지내 메탄올 농도를 일정하게 유지시키는 것은 어렵고 또한 methanol 농도를 일정하게 유지 시키고자하는 프로그램을 짜는 것은 유전자의 copy number와 외래단백질의 종류에 따라 그 메탄올 소비속도가 다르기 때문에 적절치 못하다. 본 연구는 이러한 메탄올 공급속도를 변수로 각각 다른방식 즉, step increase와 고정 공급 방식을 사용하여 실험을 진행하면서 새로운 혈소판 응집 억제제인<sup>3)</sup> saxatilin을 발현시키는데 있어서 메탄올의 공급속도에 따른 세포의 비성장속도, saxatilin의 비생산속도와의 연관관계를 밝혀 saxatilin발효를 단기간내에 최대 로 하며 기타 *Pichia pastoris*를 이용한 외래 단백질 생산의 발효공정을 최적화하는데 이바지 하고자 한다.

## 실험재료

실험에 사용된 균주는 연세대학교 심혈관 연구소에서 제공받은 재조합 *Pichia pastoris*(Mut<sup>+</sup>)이다. 이 균주는 한국의 독사인 칠점사에서 분리한 혈소판 응집 억제 펩타이드 유전자를 포함하고 있다. 플라스크 배양실험에서의 배지는 BMG(Buffered Minimal Glycerol)와 BMM(Buffered Minimal Methanol)를 사용하였으며 5L 발효를 위한 배지로는 Basal Salt Medium(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 27mL, CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.9g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15g, KOH 4.13g, 그리고 glycerol 40g)(L기준)에 PTM1을 4.4mL/L 첨가한 배지를 초기 batch phase에서 사용하였으며 50%(w/v) glycerol과 100% methanol이 glycerol fed batch phase와 methanol fed batch phase에서 각각 공급되었다.

## 실험방법

플라스크 배양실험은 재조합된 균주가 saxatilin 발현 여부를 확인하기 위해 5L 발효 실험 전에 먼저 행해졌다. 5L 발효실험은 *Pichia pastoris* 발효에서 전형적인 3단계로 나누어지는데 1단계는 glycerol batch phase(GBP)로 초기배지만을 넣어서 batch 상태에서 배양 21시간까지 지속시켰으며 2단계로는 glycerol fed batch phase(GFP)로 21시간에서 24mL/L.hr로 4시간동안 공급하였다. 이 GBP와 GFP는 궁극적으로 목적단백질을 생산하기 전에 세포를 고농도로 성장시키는데 있다. 마지막 3단계로는 methanol fed batch phase(MFP)로 목적단백질을 생산하기 위해서 메탄올을 공급하여준다. 이 MFP에서 4번의 batch를 통하여 메탄올의 공급방식을 다르게 하였는데 batch 1과 batch 4는 고정공급방식으로  $\mu$ 를 조절하지 않고 각각 27mL/L.hr, 30mL/L.hr로 고정공급 하였으며 batch 2와 batch 3은  $\mu$ 를 각각 3.15/hr와 4.18mL/hr로 일정하게 유지하면서 step increase의 방식을 통하여 공급하였다.

## 분석

OD(Optical Density)는 분광광도계를 사용하여 600nm에서 측정하였으며 메탄올과 글리세롤은 HPLC로 saxatilin의 생물학적 활성은 whole-blood aggregometer로 혈소판응집 효과를 보았고 발현의 유무는 4-12% ready gel을 사용한 전기영동으로 확인하였다. 또한 saxatilin의 농도는 phenyl sepharose를 사용해 농축하고 HPLC의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column을 사용하여 정량하였다.

## 실험결과

### 시간별 saxatilin의 발현

그림1은 batch1에서의 발효를 SDS PAGE로 4-12% gel을 사용하여 실험한 결과가

다. 1번 lane은 marker로써 saxatilin이 약 7.5kda에서 발현됨을 보여주며 2번 lane 부터 methanol induction시간이 지나갈수록 발현량이 증가함을 나타내고 있다.

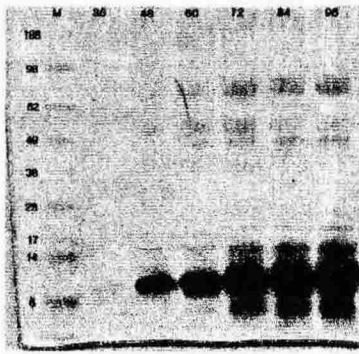


Fig.1 SDS PAGE of saxatilin with fermentation time

### methanol 공급방식의 변화에 따른 saxatilin 발현

그림 2와 3은 batch 1에서 batch 4까지의 건조균체질량과 saxatilin의 시간에 따른 발현량을 그래프로 나타낸 결과이다. 여기서

batch 1은 batch 4에 비해 세포의 성장이 느리고 최종적인 세포의 질량도 작으나 발현된 saxatilin의 양은 330mg/L로 batch 4의 240mg/L보다 더 많았고 비생산속도도 더 높았다. (Table 1참조) batch 4는 메탄올의 공급속도를 너무 빠르게 하여 메탄올이 inducer보다는 세포가 성장하는 에너지원으로 상대적으로 많이 쓰여 단백질 발현이 batch 1에 비해 적게된 것 같다. batch 2와 batch 3는 메탄올 공급을 단계적으로 증가시켜서  $\mu$ 를 각각 3.15/hr와 4.18/hr로 일정하게 유지시킨 것이다. 이 결과는 batch 1과 batch 4와 다르게 세포의 비성장속도와 단백질의 비생산속도가 비례하였다. 표1은 batch 1에서 batch 4까지 GFP에서의 specific glycerol consumption rate와 MFP에서 specific methanol consumption rate, specific saxatilin production rate, saxatilin production rate, 그리고 specific growth rate를 비교한 결과이다. 결과적으로 메탄올의 공급속도를 늘려줄수록 세포의 비성장속도가 증가하게 되며 어느 수준 이상에서는 단백질의 비생산속도가 줄어들게 된다. 따라서 비생산속도에 맞는 적절한  $\mu$ 를 선정하는 것이 중요했다. 차후 step increase 방식을 적용해  $\mu$ 를 조절하는 실험을 통하여 최적의  $\mu$ 를 찾는 실험이 계속 진행되어야 할 것이다.

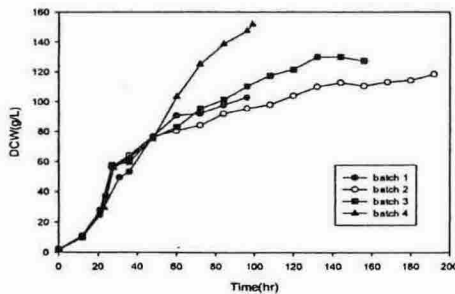


Fig.2 Time-course of the changes in dry cell weight

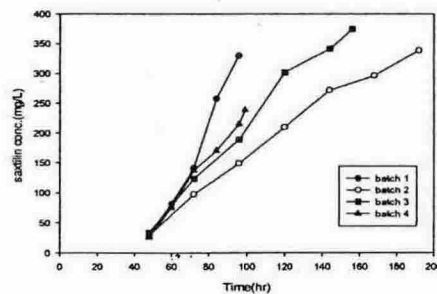


Fig.3 Time-course for saxatilin concentration

Table 1. Comparison of several factors for four batches

	batch 1	batch 2	batch 3	batch 4
specific glycerol consumption rate(g-glycerol/g-cell.hr)	0.107	0.091	0.092	0.104
specific methanol consumption rate(g-methanol/g-cell.hr)	0.376	0.110	0.099	0.156
specific saxatilin production rate(mg-saxatilin/g-cell.hr)	0.283	0.079	0.071	0.0609
saxatilin production rate(mg-saxatilin/hr)	6.870	2.830	3.825	4.68
specific growth rate( $\times 10^{-3}$ )/hr	10----3	3.150	4.780	19----3

### 요약

메탄올 자화효모인 *Pichia pastoris*는 메탄올에 의해 유도되는 강력한 AOX1 프로모터의 존재로 인하여 외래 단백질의 생산을 위한 가장 좋은 숙주중의 하나이다. methanol fed batch phase(MFP)동안에 메탄올의 공급은 그 메탄올이 단백질의 발현을 유도하며 또한 숙주에게 에너지원으로 쓰이기 때문에 매우 중요하다. 과량의 메탄올은 세포의 성장을 저해하며, 반면에 불충분한 메탄올의 공급은 세포를 느리게 자라게 하고 생산성도 떨어뜨린다. 본 연구는 새로운 혈소판 응집 억제제인 saxatilin의 생산성, 혹은 수율을 최대화 하기 위해서 메탄올의 공급속도와 세포의 비성장속도를 조절하였다.

### 참고문헌

1. Cregg J., M. and Higgins D., R., Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*,(1995) Can. J. Bot, 73, 891-897
2. Clare J., J., Romanos M., A., Rayment F., B., Rowedder J., E., Smith M., A., Payne M., M., Sreekrishna K. and Henwood C., A., Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies,(1991) Gene, 105, 205-212
3. Kang I., C., Chung K., H., Lee S., J., Yun Y., D., Moon H., M. and Kim D., S., Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake(*Agkistrodon Halys Brevicaudus*) venom,(1998) Thrombosis Research, 91, 65-73
4. Katakura Y., Zhang W., Zhuang G., Omasa T., Kishimoto M., Goto Y. and Suga K., I., Effect of methanol concentration on the production of human  $\beta_2$ -glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*(1998) Journal of fermentation and bioengineering, 86, 482-487
5. Guaran, M.M., Lesnicki, G. J., Tam, B. M., Rodziminski, C. Z., Hasenwinlle, D., Boraston, A., Jervis, E., MacGillivray, R. T. T., Turner, R.F.B. and Kilburn, D. G.(1997) Biothchnol.Bioeng. 56, 279-286