

## Tetraacetylphytospingosine (TAPS) 생산을 위한 *Pichia ciferrii*의 균주 개량과 TAPS 생산에 대한 sodium acetate의 영향

홍성갑, 유연우

아주대학교 일반대학원 분자과학기술학과

전화 (031) 219-2455, FAX (031)216-8777

### Abstract

Experiments were carried out to develop of mutant strain from *Pichia ciferrii* ATCC 14091 and investigate the effect of sodium acetate on the production of tetraacetylphytospingosine (TAPS). A high-TAPS producing mutant was simply selected by staining with sudan black B and colony shape after the treatment of UV and NTG. Sodium acetate enhanced the TAPS production.

### 서론

Sphingolipid의 일종인 ceramide는 membrane을 형성하는 중요한 성분일 뿐만 아니라 다양한 생물학적 기능이 밝혀지면서 피부재생에 관한 화장품원료와 항균, 항염, 항암제로 개발이 모색되고 있다. *Pichia ciferrii*는 아세틸화된 phytospingosine의 유도체인 Tetraacetylphytospingosine (TAPS)를 합성하여 세포 밖으로 분비하고 쉽게 phytospingosine으로 전환된다. 또한 사람의 피부와 동일한 D-erythro (2S, 3R) 구조를 갖고 있어 사람의 피부와 친화성이 있는 ceramide를 합성하는 전구체로 사용될 수 있다<sup>1)</sup>. 본 연구에서는 TAPS 생산능이 우수한 균주를 찾기 위해 *Pichia ciferrii* ATCC 14091의 포자를 물리, 화학적인 방법으로 돌연변이를 유도하여 Sudan Black B 염색법으로 먼저 지방산 생산이 우수한 변이균주를 선별한 후에 콜로니 형태 관찰과 같은 간단한 방법을 통하여 최종적으로 우수 변이균주를 선별하였다. 또한 선별한 변이균주를 이용하여 TAPS 생산의 전구체인 acetyl-CoA를 제공하는 sodium acetate에 대한 영향을 검토하였다.

### 재료 및 실험방법

본 연구에서는 주식회사 두산에서 분양 받은 *Pichia ciferrii* ATCC 14091을 malt extract slant agar (5 % malt extract, 2 % agar)에서 25℃ 배양조건에서 2주간 배양하여 hat-shape spore를 얻었으며, lyticase (Sigma, 800 unit/mg)을 spore

suspension 1 ml 당 100 unit씩 처리하여 cell wall을 degradation 시킨 후 55°C 조건에서 heat shock을 2분 동안 처리하여 single spore를 얻었다. UV를 이용한 변이유도는 irradiation source (Spectroline model ENF-260c 115 V, 60 Hz, 60amps, USA)로부터 6 cm 거리를 두어 254 nm 파장 하에서 실시하였다. 1-N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG, Sigma)를 이용한 변이유도는 최종농도 0.4%가 되도록 NTG을 처리한 후 이를 시간별로 YPD agar 배지 (glucose 20 g/L, peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L)에서 키운 후 YMGL agar 배지 (glycerol 30 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 1 g/L, peptone 1 g/L)에 replica plating을 하였다. Screening 방법으로는 지방산 생성능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 70% ethyl alcohol 100 ml에 sudan black B 0.2 g를 녹여 만든 sudan Black B 염색액 일정량을 각각의 콜로니에 떨어뜨려 염색시킨 후 진한 암청색 침전물이 상대적으로 많은 콜로니를 선별하였다. 선별한 변이균주들을 250 ml baffled flask (working volume : 30 ml)을 이용하여 TAPS 발효배지 (glycerol 120 g/L, yeast extract 2 g/L, KNO<sub>3</sub> 3 g/L, citrate 1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O g/L, CaCl<sub>2</sub> 2 g/L, CSP 1.5 g/L)에서 배양하여 TAPS 생성이 우수한 균주를 선별하였다. TAPS의 분리 및 분석은 Chloroform과 methanol을 2:1 비율로 혼합한 용액을 배양이 끝난 TAPS 배양액 부피의 4배가 되도록 가하여 추출한 후 HPLC (Waters 410, USA)와 ELSD detector (Alltech ELSD 2000, USA)를 이용하여 정량분석을 하였다. Hexane과 Acetone을 1:1로 혼합한 용매를 이동상으로 사용하였고 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 분석에 사용한 column은 YMC-pack SIL (YMC, Japan)을 사용하였으며 tube 온도는 50°C, gas flow (N<sub>2</sub>)는 1.5 L/min으로 설정하였다.

## 결과 및 고찰

### 우수변이균주의 선별

Sudan Black B 염색법을 통해 중성지방산 생성이 우수한 균주를 선별<sup>2)</sup>하였다. 선별한 변이균주 UV-P17, UV-P63과 wild type-P31을 glycerol 120g인 TAPS 발효배지에서 배양한 결과를 table 1에 나타내었다. 실험결과에서 TAPS 생산이 약간 증가하였으며 TAPS 생산의 최적 pH가 8인 변이균주 UV-P63을 선정하였다.

Table 1. TAPS production and optimal pH of wild type and mutant strains

	Optimal production pH	TAPS (g/L)
Wild type-P31	pH 6	3.3
UV-P17	pH 6	3.4
UV-P63	pH 8	4.0

Sudan Black B 염색을 통해 1차 선별한 변이균주 UV-P63에 NTG를 처리한 후 TAPS 발효 agar 배지에서 6일간 배양하여 Lynferd J. Wickerham 등<sup>3)</sup>이 제시한 바와 같이 콜로니 형태별로 분리하였다, 그 결과 table 2에서 제시한 것과 같이 smooth glistening type보다 광택이 없는 smooth type이 TAPS 생산에 유리한 콜로니 형태이며 가장 좋은 콜로니 형태는 rough type이었다. 이는 세포 밖으로 분비된 TAPS가 세포벽을 소수성으로 바꾸었기 때문이다. 이 방법을 통해 탄소원인 glycerol 120 g/L을 이용하여 4.6 g/L의 TAPS를 생산하는 변이균주인 UV-P63-NTG4를 얻었다.

Table 2. Colony shape type on agar plate and TAPS production in flask culture used TAPS fermentation medium of glycerol 30 g/L (Unit: TAPS g/L)

Group	Colony shape type		
	Smooth glistening	Smooth	Rough
1	0.2	0.4	1.4
2	0.5	1.1	1.4

### Sodium acetate의 효과

Sodium acetate를 TAPS 발효배지 성분 중 citrate 1 g/L 대신 1~4 g/L 범위로 첨가하여 TAPS 발효배지 30 ml를 250 ml baffled flask로 교반속도 160 rpm으로 7일간 진탕배양을 하였다. 실험결과 (table 3)에서 sodium acetate를 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 TAPS 생성이 약 68~100% 증가하였으며, 특히 3 g/L의 sodium acetate를 첨가한 경우에서 6.8 g/L의 TAPS를 생산할 수 있었다. Sodium acetate 1g/L 첨가균을 제외하고는 sodium acetate로 인한 세포생장의 증가는 발견할 수 없었으나 TAPS 생산량과 수율, 생산성을 증가시켰다. 이는 Sodium acetate가 지방산의 building block인 acetyl-CoA로 전환되어 지방산과 TAPS 생산에 도움을 주는 것으로 보여진다. 대부분의 acetyl-CoA는 해당과정을 경유하여 육탄당으로부터 유도되거나 미토콘드리아에서 pyruvate의 decarboxylation을 통해 생성되거나

acetic thoikinase의 효소반응에 의해 acetate와 coenzyme A를 이용하여 만들어진다<sup>4)</sup>

Table 3. Effect of sodium acetate on production of TAPS in flask culture

	Cell mass (g/L)	Final pH	TAPS (g/L)	Y <sub>T/G</sub> (g/g)	P <sub>T</sub> (g/hr)
Control	33.5	7.0	3.30	0.036	0.027
Sodium acetate 1g/L	41.0	6.4	5.45	0.082	0.045
Sodium acetate 2g/L	33.3	7.7	5.56	0.072	0.046
Sodium acetate 3g/L	32.1	7.5	6.80	0.089	0.057
Sodium acetate 4g/L	27.9	7.7	5.61	0.107	0.047

### 요약

Ultraviolet과 NTG 처리를 통한 mutagenesis를 통해 TAPS 생산균주인 *Pichia ciferrii* ATCC 14091로부터 많은 mutant들을 얻었으며 Sudan Black B 염색법과 콜로니 형태 관찰을 통하여 TAPS 생산이 우수한 변이균주를 선별하였다. 또한 sodium acetate 첨가를 통하여 TAPS 생산을 향상시켰다. 이는 TAPS가 포화중성 지방산인 palmitate와 serine의 축합반응으로 생성되며<sup>5)</sup>, sodium acetate로 부터 생성된 acetyl-CoA에 의해 아세틸화되어 세포 밖으로 분비되기 때문이다<sup>3)</sup>.

### 참고문헌

1. 박장서, "세라마이드의 산업적 생산기술 개발에 관한 연구" (1998), 산업자원부 공업기반기술개발사업의 기술개발보고서
2. 함경식, "유지생산균 *Rhodotorula gracilis* NRRL Y-1091로 부터 지방구의 분리와 특성에 대한 연구" (1983), 한국과학기술원 석사논문
3. Lynferd J. Wicherham, Frank H. Stodola, "Foramtion of extracellular sphingolipides by microorganism"(1960), J. biol. chem, 235, 2584-2591
4. John D.weete. "Lipid biochemistry of fungi and other organism" (1980), 96-98
5. Greene ML, Kaneshiro T, Law JH. "Studies on the production of sphingolipid bases by the yeast, *Hansenula ciferrii*."(1965), Biochim Biophys Acta, 98(3), 582-588.