

효모 *Pichia ciferrii* mutant의 Tetraacetylphytosphingosine 생산에 미치는 아미노산의 영향

홍성갑, 유연우

아주대학교 일반대학원 분자과학기술학과 발효대사실험실
전화 (031) 219-2455 FAX (031) 216-8777

영문abstract

Experiments were carried out to the effect of various amino acids on the production of tetraacetylphytosphingosine (TAPS). Among various amino acids were tested, cysteine decreased the production of TAPS at 7 days of flask culture. Especially, Serine is precursor of TAPS but didn't affect the production of TAPS. Glycine and glutamate increased the production of TAPS. Especially, glutamate increased 20% of cell mass and 37% of TAPS production.

서론

Sphingolipid의 한 종류인 ceramide는 피부 각질층의 주요한 성분일 뿐만 아니라 lamella 구조의 형성 및 유지에 중요한 역할을 하므로 고가의 화장품의 원료로 사용되고 있으며, 암과 염증성 질환을 중재할 수 있는 목표 생리활성 물질로 전 세계적으로 많은 의·약학 연구자들의 관심이 집중되고 있다. 효모 *Pichia ciferrii*에 의해 생산되는 TAPS는 쉽게 탈아세틸화 시킴으로 ceramide로 전환이 가능한 물질로 palmitoyl-CoA와 아미노산인 L-serine으로부터 합성된다.¹⁾ 이 연구에서는 TAPS 생산에 영향을 줄 것으로 예측되는 serine과 serine 합성에 관련된 amino acid들의 TAPS 생산에 대한 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용된 균주는 TAPS를 생산하기 위해 *Pichia ciferrii* ATCC 14091을 두산 기술원으로 분양 받아 sporation 시킨 후 Mutagen인 UV와 NTG로 random mutation 시켜 얻은 돌연변이주인 *Pichia ciferrii* UV-P63-NTG4를 사용하였으며 TAPS 생산에 미치는 amino acid의 영향을 알아보기 위하여 총 배양기간 7일 중 3 일째에 amino acid들을 각각 1 g/L씩 첨가한 후 TAPS 발효배지 (glycerol 100

g/L, yeast extract 2 g/L, KNO₃ 3 g/L, sodium acetate 3 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L, CSP 1.5 g/L pH 5.0) 30 ml를 250 ml baffled flask로 교반 속도 180 rpm으로 진탕 배양을 하였다. 실험에 사용한 amino acid는 glycine, serine, cysteine, glutamate 등이며 이들은 biochemical pathway 상에서 TAPS의 전구체인 serine 합성에 관련된 amino acid들이다. Cell mass는 spectrophotometer (UV-1201, shinmadzu, Japan)를 사용하여 660nm에서 optical density를 측정하여 흡광도와 건조 균체량의 표준곡선에 의해서 건조균체량 (g/L)으로 환산하였으며 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, U. S. A)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 57°C, gas flow (N₂)는 1.7 L/min으로 설정하였다.

결과 및 고찰

Peter 등은 pyridoxal-phosphate가 serine을 활성화시켜 palmitate와 축합반응을 유도하며 cysteine은 초기 축합반응을 방해할 뿐만 아니라 sphingolipid base 생성에 필요한 환원반응을 반응한다고 보고하였다.²⁾ 이는 여러 가지 amino acid들과 vitamin들이 TAPS 생성에 관련된 enzyme의 cofactor로 사용됨을 시사한 것이다.

Table 1. Effect of amino acid on the TAPS production in flask culture

	Cell mass (g/L)	Final pH	TAPS (g/L)	Y _{T/G} (g/g)	P _T (g/hr)
Control	35.43	8.57	7.01	0.081	0.042
Threonine	34.16	8.19	7.60	0.086	0.045
Glycine	34.29	8.29	8.75	0.097	0.052
Glutamate	42.50	8.61	9.65	0.096	0.057
Serine	35.47	7.89	6.52	0.072	0.039
Cysteine	35.19	8.43	4.43	0.046	0.026

Table 1을 보면 cysteine의 경우 Peter 등의 연구 보고와 같이 TAPS 생성을 저해

시켰으나 serine은 TAPS의 전구체임에도 불구하고 TAP 농도의 향상을 기대할 수 없었다. 그러나 serine의 전구체가 되는 glycine의 첨가는 약 25%의 TAPS 농도의 증가를 보여주었다. 이는 TAPS 생합성은 serine과 palmitoyl-CoA의 중합반응으로 시작이 되나 이 반응이 rate limiting step이기 때문에 초과로 공급된 serine은 TAPS로 전환되지 못하고 glycine, cysteine과 같은 amino acid로 전환되었으나, glycine과 같은 amino acid의 첨가는 feed back inhibition에 의해 serine의 다른 amino acid의 전환을 방해할 하거나, 필요시 serine으로 전환이 가능하기 때문인 것으로 생각된다. Glutamate의 첨가는 37.7%의 가장 많은 TAPS의 증가를 보였으며 그 원인은 질소원으로 작용하여 약 20%의 cell mass의 증가에 따른 product의 증가와 serine 합성에 필요한 ammonium 이온의 donor로 작용하였기 때문으로 생각된다.

요약

효모 *Pichia ciferrii*에 의해 생산되는 TAPS는 쉽게 탈아세틸화 시킴으로 ceramide로 전환이 가능한 물질로 palmitoyl-CoA와 아미노산인 L-serine으로부터 합성된다. 따라서 TAPS 생산에 영향을 줄 것으로 예측되는 serine과 serine 합성에 관련된 amino acid들의 TAPS 생산에 대한 영향을 조사한 결과 cysteine은 TAPS 생성에 방해할 주었으며 serine은 TAPS의 전구체임에도 불구하고 TAPS 농도의 향상을 기대할 수 없었다. 그러나 serine의 전구체가 되는 glycine의 첨가는 약 25%의 TAPS 농도의 증가를 보여주었으며 특별히 glutamate의 첨가는 20%의 cell mass의 증가와 37.7%의 가장 많은 TAPS의 증가를 보여주었다.

참고문헌

- 1) Yechezkel Barenholz, Nathan Gadot, Eliyahu Valk, Shimon Gatt, "Identification of the enzymatic lesions responsible for the accumulation of acetylated sphingosine bases in the yeast *Hansenula ciferrii*", *Biochimica et biophysica Acta*, 306 (1973), 341-345
- 2) Peter E. Braux and Esmond E. Snell, "Biosynthesis of Sphingolipid bases", *The journal of biological chemistry*", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Sd.* 349, S (1968). 1149-1156