

## *Pichia pastoris* 유가식 배양을 이용한 재조합 HBsAg 생산에서 sorbitol이 미치는 영향

이경훈, 김동일

인하대학교 공과대학 화공생명공학부

전화 (032) 860-7515, FAX (032) 872-4046

### Abstract

*Pichia pastoris*, a methylotrophic yeast widely used for the production of heterologous proteins, was used to produce Hepatitis B surface antigen (HBsAg) under the control of the strong, tightly-regulated alcohol oxidase promoter. It is highly induced during the growth on methanol, but the presence of non-methanol carbon sources such as glycerol and glucose repressed fully the expression of alcohol oxidase. In this study, glycerol and sorbitol feedings for the expression of the recombinant HBsAg were compared to examine the potential of sorbitol as a less repressive carbon source in fed-batch fermentation. The sorbitol feeding enhanced the production yield by 12% compared to that in glycerol feeding, although the cell concentration was lower.

### 서론

효모는 세포내 소기관을 갖고 있는 진핵세포로 post-translational modification이 가능하며 현재 산업적으로 외래 단백질 생산에 널리 이용되고 발현 시스템이다. 재조합 단백질 생산을 위한 효모 숙주로 가장 널리 알려진 것은 *Saccharomyces cerevisiae*이다. 하지만 *S. cerevisiae*의 경우 분비되는 단백질이 과당화되어 생체 내에서 면역반응을 일으키고 활성이 감소하며 재조합 단백질의 혈청 내에 지속 시간도 떨어지는 경향을 보인다. 그리고 *S. cerevisiae*에서 분비되는 많은 단백질들은 periplasmic space내에 존재하기 때문에 정제가 어렵고 수율이 감소한다. 따라서 *S. cerevisiae* 시스템의 단점을 보완하는 상업적 외래단백질 발현 형질전환 효모 시스템으로 최근에는 메탄올 자화효모인 *Pichia pastoris*를 많이 이용하고 있다. *P. pastoris* 시스템에서는 메탄올 대사에 관련되는 유전자들로부터 유래되는 발현은 조절이 용이하면서도 매우 강력한 alcohol oxidase(AOX) promoter를 갖고 있어 산업적 가치가 매우 높다. AOX promoter는 glucose, glycerol, 또는 ethanol과 같은 탄소원이 존재시 억제되는 반면에 methanol을 탄소원으로 이용할 때는 발현이 유도되

는 특징을 갖는다. 따라서 *P. pastoris*를 이용한 외래 단백질 생산에서 methanol에 의한 AOX promoter 유도시 배지 내의 glycerol, glucose 또는 ethanol 등의 간존 탄소원은 단백질 발현에 중요한 영향을 미친다. 본 연구에서는 형질전환 *P. pastoris*를 이용한 재조합 HBsAg 생산에서 유가식 발효 중 공급 탄소원으로 sorbitol이 AOX promoter의 단백질 발현에 미치는 영향을 glycerol과 비교하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에서 벡터로는 pHIL-D2를 이용하였고, 벡터 증폭은 *E.coli* DH5 $\alpha$ 을 이용하였다. 실험 균주로는 *P. pastoris* GS115(Mut<sup>+</sup>)를 숙주균주로하여 HBsAg 유전자도 도입된 벡터 pHIL-D2를 이용하여 *P. pastoris* GS115(Mut<sup>S</sup>)형태로 형질전환된 균주를 이용하였다.

### 배양

플라스크 배양은 500 mL 플라스크에서 2% glycerol 100 mL BMGY 배지를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 배양하였고, 5 L 발효조 배양은 3 L 조업 부피로 30°C에서 pH 5.0, DO 30% 이상을 유지하면서 배양하였다. 유가식 배양용 공급배지로는 50% glycerol과 50% sorbitol에 basal salts를 첨가한 것을 이용하였다. 플라스크 배양은 각각 배양 36시간 후에 공급배지 1 mL씩 첨가하였고, 5 L 발효조 배양에서는 배양 19시간 후에 10 mL/L/h로 첨가해 주었다. Methanol 유도의 경우 플라스크 배양은 1 mL씩 첨가하였고 5 L 발효조에서는 1 mL/L/h로 첨가해 주었다.

### 분석방법

균체 농도는 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 균체량은 배양액 1 mL를 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 pellet을 증류수로 2회 세척한 후 55°C 건조기에서 24시간 건조하여 건조 균체량을 측정하였다. HBsAg 정량분석은 배양액 1 mL을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 남은 pellet을 증류수로 2회 세척한 후 glass bead와 파쇄 buffer를 이용하여 30분간 파쇄하고 다시 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취하고 reversed passive hemagglutination(RPHA) 방법으로 확인하였다.

## 결과 및 고찰

플라스크 배양과 5 L 발효조 배양에서 세포 증식 측면은 50% glycerol을 공급한 경우와 50% sorbitol을 공급한 경우 methanol 유도가 있기 전까지는 차이를 보이지

않는다. 하지만 methanol 유도가 있는 후부터 50% glycerol을 공급한 것이 50% sorbitol을 공급한 것보다 10% 정도의 O.D. 증가를 보였다. 이것은 glycerol이 sorbitol보다 에너지원 이용 측면에서 affinity가 높기 때문에 이와 같은 결과를 보인 것으로 판단된다(Figures 1, 2).

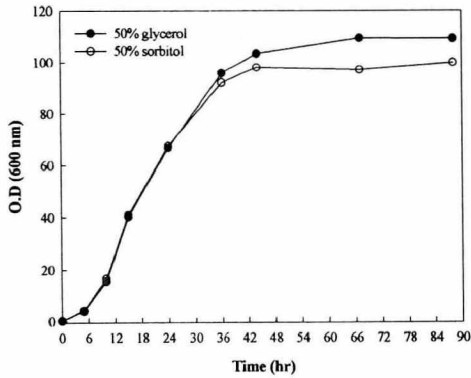


Figure 1. Cell growth in 500 mL flasks.

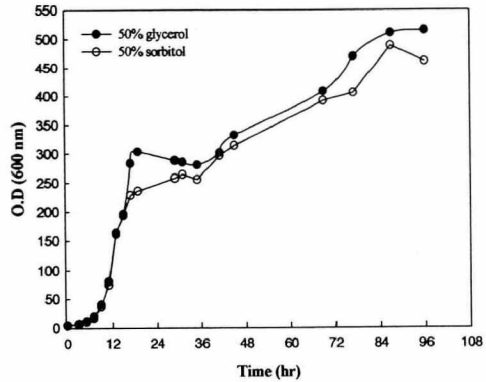


Figure 2. Cell growth in 5 L fermenter.

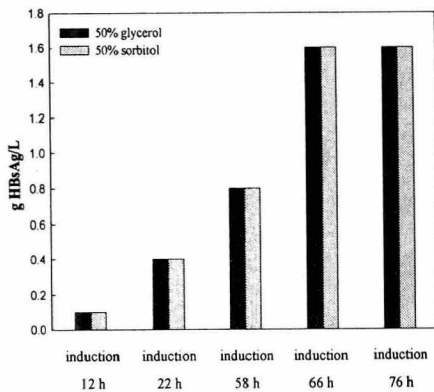


Figure 3. Concentration of HBsAg according to the induction time.

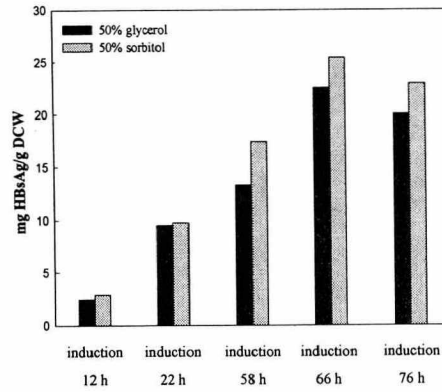


Figure 4. Production yield of HBsAg according to the induction time.

HBsAg 발현 분석은 단위 건조 균체량당 발현량으로 측정하였다. 실험결과 단위 부피당 HBsAg 발현량의 경우 50% glycerol과 50% sorbitol에서 차이가 없었으나

(Figure 3), 단위 건조 균체량당 최대 HBsAg 발현량은 50% glycerol의 경우 22.5 mg HBsAg/g DCW이었고, 50% sorbitol에서는 25.4 mg HBsAg/g DCW 이었다 (Figure 4).

결과적으로 유가식 배양시 공급 배지로 50% sorbitol을 탄소원으로 이용했을 때 50% glycerol을 사용하는 것보다 methanol 유도에 의한 HBsAg의 단위 건조 균체량당 발현량이 12% 향상된 결과를 보임을 알 수 있었다.

#### 요약

본 연구에서는 형질전환된 *P. pastoris*를 이용한 재조합 HBsAg 생산에서 유가식 배양시 공급배지 탄소원으로 sorbitol이 단백질 발현에 미치는 영향을 glycerol과 비교하여 실험하였다. 유가식 배양 공급배지 탄소원으로 50% sorbitol을 이용했을 때 50% glycerol을 이용하는 경우보다 세포 증식 측면에서는 methanol 유도 후 균체 농도가 낮은 경향을 보였으나 이것은 glycerol이 sorbitol보다 에너지원으로써 높은 affinity를 가지기 때문인 것으로 판단된다. 하지만 단위 건조 균체량당 단백질 발현량은 50% sorbitol을 공급 한 경우 50% glycerol을 공급한 경우 보다 12% 향상되는 결과를 보였다. 따라서 유가식 배양용 공급 탄소원으로 sorbitol을 이용했을 때 glycerol을 이용하는 것보다 AOX promoter에 의한 단백질 발현에 보다 긍정적인 효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다.

#### 참고문헌

1. Helene B., L. Celine, C. Patrick, R. Fabien, V. Christine, C. Yves, and M. Guy (2001) High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* **36**, 907-913.
2. Emma D. T., M. C. d'Anjou, and A. J. Daugulis (1999) Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **21**, 669-672.