

Pichia pastoris GS115(pPIC9K-proNK)재조합 피브린분해효소의 발현에 미치는 몇가지 배양조건의 영향

리은성, 현철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학부문에서는 세포공학과 유전자공학, 미생물공학을 비롯한 현대생물학의 발전에 큰 힘을 넣으며 현대생물학의 성과를 농업과 축산업, 의학과 식료공업에 널리 받아들여 생산성이 높은 농작물과 집짐승의 새 품종을 만들어내며 질 좋은 여러가지 의약품과 식료품을 많이 생산할수 있도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487~488 페이지)

혈전전색성질환을 치료하는데서 혈전용해제의 투여에 의한 혈전용해요법이 중요한 치료방법으로 되고있으며 특히 피브린에 대한 기질특이성이 높은 세린프로테아제인 고초균 기원의 피브린분해효소에 의한 혈전용해가 주되는 치료방법으로 되고있다. 우리는 《청곡키나제》생산균주인 *Bacillus subtilis natto*-89의 피브린분해효소를 분비하는 효모균주 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)체계를 구축[1]한데 기초하여 재조합피브린분해효소의 유도발현에 미치는 몇가지 배양조건의 영향을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

배양균주로는 피브린분해효소유전자를 형질전환시킨 효모균주 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)[1]를 리용하였다. 종균배지로는 YPD배지, 초기배지로는 BMGY배지, 유도배지로는 BMMY배지를 리용하였다. 효소활성측정에는 합성기질 S-7388(N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide)(《Aladdin》), 피브리노젠(《Calbiochem》), 트롬빈(《Calbiochem》)을 리용하였다.

배양조건을 밝히기 위한 실험에서 배양액의 효소활성은 합성기질분해활성측정법[2, 4]으로, 최적배양조건에서 배양액의 효소활성은 피브린평판법[3]으로 측정하였다.

합성기질에 의한 활성측정방법은 다음과 같다.

20mmol/L의 트리스-염산(pH 8.0) 400μL, 1mmol/L의 합성기질을 80μL 포함하는 반응용액에 10μL의 효소용액을 첨가하고 37℃에서 10min동안 방치한다. 100μL의 30%(v/v) 초산을 첨가하여 반응을 멈춘다. 기질로부터 분해되어 나온 *p*-니트로아닐리드의량을 분광광도계로 405nm에서의 흡광도를 측정한다. 이때 *p*-니트로아닐리드의 몰흡광계수는 8 900 (L·mol⁻¹·cm⁻¹)으로 한다. 효소활성 1U는 실험조건에서 1min동안에 1ng의 *p*-니트로아닐리드를 생성하는 효소의 양으로 정의한다.

결과 및 논의

1) 메타놀농도의 영향

YPD배지에서 재조합균주를 진탕배양(30℃, 250r/min, 24h)한 다음 BMGY배지에 1% 되게 접종하여 초기배양(30℃, 250r/min, 24h)을 진행하고 각이한 농도의 메타놀을 포함한 BMMY배지에서 유도배양을 진행하였다. 이때 24h 간격으로 메타놀을 각이한 농도로 첨가해주었다. 유도배양 4일만에 배양상청액의 합성기질분해활성을 측정하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 메타놀농도가 1.5% 일 때까지는 유도제의 농도가 증가함에 따라 배양상청액의 활성은 증가하였으나 1.5%이상에서부터는 큰 차이가 없었다. 이로부터 재조합피브리분해효소의 발현에 적합한 메타놀의 농도는 1.5%라고 볼 수 있다.

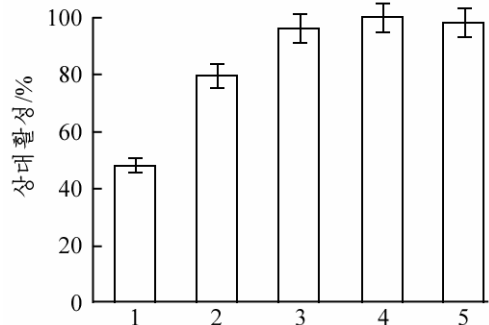


그림 1. 재조합피브리분해효소활성에 미치는 메타놀농도의 영향
1-5는 메타놀농도가 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5%인 경우

2) 유도배양시간의 영향

재조합피브리분해효소의 발현에 미치는 유도배양시간의 영향을 조사하기 위하여 BMGY배지에서 초기배양(30℃, 250r/min, 24h)을 진행하고 1.5%의 메타놀을 포함한 BMMY배지에서 유도배양을 시작하였다. 24h 간격으로 메타놀을 1.5% 되게 첨가해주면서 유도배양 7일까지 매일 배양시료를 취하여 활성을 측정하였다.(그림 2)

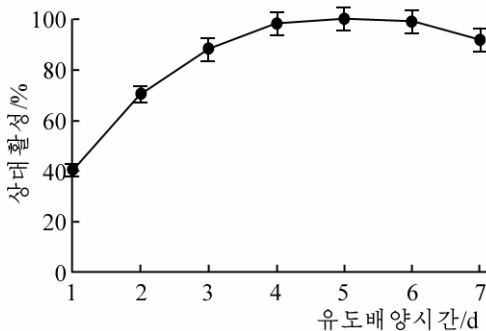


그림 2. 재조합피브리분해효소의 활성에 미치는 유도배양시간의 영향

그림 2에서 보는바와 같이 유도배양을 시작하여 4일부터 배양상청액의 효소활성에서 큰 차이가 없었다. 이로부터 메타놀유도배양시간을 4일로 하는것이 합리적이라고 보았다.

3) 유도온도의 영향

BMGY배지에서 초기배양(30℃, 250r/min, 24h)을 진행하고 BMMY배지에 메타놀의 농도가 1.5% 되게 24h간격으로 첨가하면서 각이한 온도 조건에서 유도배양을 진행하였다. 매 조의 배양시료에서 24h 간격으로 시료를 수집하여 상청액의 활성을 측정하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 30℃와 28℃에서 유도배양을 진행할 때 배양상청액의 효소활성에서 유의성있는 차이가 나타나지 않았으며 25, 23℃로 유도온도를 낮출 때 배양액의 활성이 감소하였다. 이것은 서로 다른 온도조건에서 유도배양할 때 세포의 성장능력이 떨어지면서 배양액의 균체밀도가 감소하는것과 주요하게 관련된다.(그림 4)

이로부터 우리는 재조합피브리분해효소의 발현에 적합한 온도를 28℃로 정하였다.

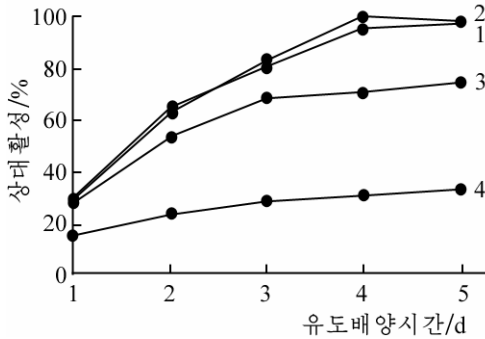


그림 3. 재조합피브린분해효소활성에 미치는 유도온도의 영향
1-4는 유도온도가 각각 30, 28, 25, 23°C인 경우

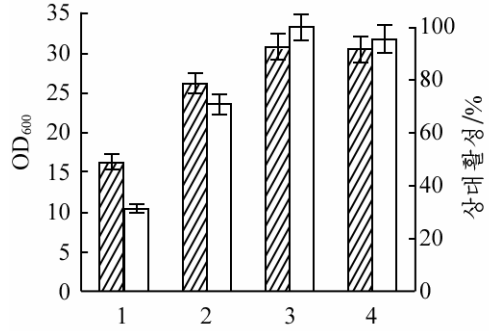


그림 4. 재조합피브린분해효소활성과 균체밀도사이의 관계
1-4는 유도온도가 각각 23, 25, 28, 30°C인 경우;
▨-OD₆₀₀, □-상대활성

4) 배양액 초기pH값의 영향

BMGY초기배지의 pH값을 4.0~7.5범위에서 변화시키면서 초기배양을 24h동안 진행하고 1.5%의 메타놀을 포함한 BMMY배지에서 유도배양하면서 4일만에 배양액을 수집하여 균체밀도(OD₆₀₀)와 상청액의 효소활성을 측정하였다.(그림 5)

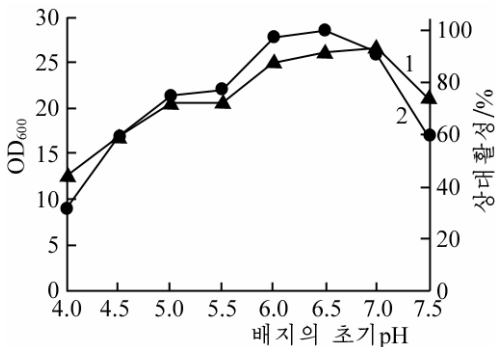


그림 5. 재조합피브린분해효소활성에 미치는 배양액초기pH의 영향
1-OD₆₀₀, 2-상대활성

그림 5에서 보는바와 같이 배양액의 초기pH값이 높아짐에 따라 배양상청액의 효소활성은 점차 증가하였으며 pH 6.0~6.5일 때 배양상청액의 효소활성이 가장 높고 그보다 높은 pH값에서는 활성이 감소하였다. 이것은 초기배지의 pH값이 5보다 낮으면 초기배양에서 균체의 생장이 지장을 받고 결국은 유도에 들어가는 균체밀도가 작아지는데 원인이 있다고 볼수 있다. 재조합피브린분해효소는 알카리성프로테아제이므로 pH값이 높아짐에 따라 효소의 안정성문제가 제기되지 않는다. 그럼에도 불구하고 pH 7이상에서 효소활성이 낮아지는것은 역시 균체밀도가 작는데 원인이 있다고 볼수 있다.

5) 초기배양시간의 영향

pH 6.0인 BMGY배지에서 재조합균주의 초기배양을 각이한 시간동안 진행(30°C, 250r/min)하고 1.5% 메타놀을 포함한 BMMY배지에서 4일 유도배양한 후 배양상청액의 활성을 측정하였다.(그림 6)

그림 6에서 보는바와 같이 초기배양시간이 늘어남에 따라 배양상청액의 효소활성은 증가하였으며 초기배양 24h이후부터는 효소활성이 별로 차이 나지 않았다. 이로부터 우리는 24h초기배양이 효소의 발현에 적합하다고 보았다.

이로부터 재조합피브린분해효소의 합리적인 유

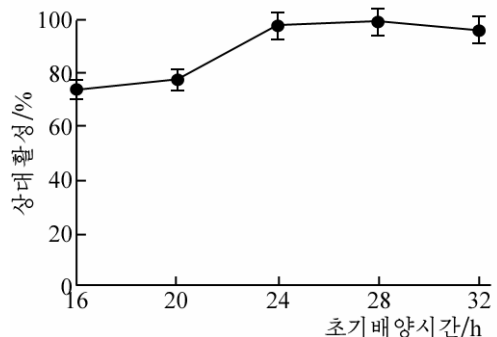


그림 6. 재조합피브린분해효소 활성에 미치는 초기배양시간의 영향

도발현조건을 초기배양시간 24h, 배지의 초기pH 6.0, 메타놀농도 1.5%, 유도온도 28℃, 유도배양기간 4일로 정하였다. 이 조건에서 재조합효모를 배양하였을 때 배양상청액의 피브린분해활성은 3 040IU/mL로서 제일 높았다.

맺 는 말

Pichia pastoris GS115(pPIC9K-proNK)배양에 의한 재조합피브린분해효소의 합리적인 유도발현조건은 초기배양시간 24h, 배지의 초기pH 6.0, 메타놀농도 1.5%, 유도온도 28℃, 유도배양기간 4일이다. 이 조건에서 재조합효모를 배양할 때 배양상청액의 피브린분해활성은 3 040IU/mL이다.

참 고 문 헌

- [1] 리은성 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 5, 52, 주체106(2017).
- [2] Chen-Tien Chang et al.; Food Chemistry, 133, 1611, 2012.
- [3] S. H. Wang et al.; World J. Microbiol. Biotechnol., 24, 475, 2008.
- [4] Thao Thi Nguyen et al.; Microbial Cell Factories, 12, 79, 1, 2013.

주체107(2018)년 1월 5일 원고접수

Influence of Several Culture Conditions on Expression of Recombinant Fibrinolytic Enzyme by *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)

Ri Un Song, Hyon Chol

The reasonable induced expression conditions for recombinant fibrinolytic enzyme expression by *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK) are as follows: initial fermentation time is 24h, initial pH—6.0, methanol concentration—1.5%, induction temperature—28℃, induction time—4d. In these conditions, the fibrinolytic activity of the culture supernatant is 3 040IU/mL.

Key words: fibrinolytic enzyme, *Pichia pastoris*, expression