

## 메라놀동화효모에서 발현시킨 고초균피브린 분해효소의 몇가지 효소학적특성

리은성, 현철, 송창일

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

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

우리는 《청곡키나제》생산균그루인 *Bacillus subtilis natto*-89의 피브린분해효소를 발현하는 효모균그루 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)를 구축[2]하고 배양액으로부터 재조합피브린분해효소를 분리정제[1]한데 이어 재조합피브린분해효소의 몇가지 효소학적특성을 밝히기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

효소학적특성연구에는 재조합균그루 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)를 BMGY, BMMY배지에서 유도배양한 다음 배양액의 상청액을 세파덱스-100(《Pharmacia》)겔크로마토그래프법과 DEAE섬유소(《Whatman》)이온교환크로마토그래프법으로 정제[1]하여 얻은 시료를 리용하였다. SDS-PAGE는 5% 농축겔, 12% 분리겔에서 선행방법[3]으로 진행하였다. 효소활성측정을 위한 합성기질로는 S-7388(N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide, 《Aladdin》)을 리용하여 선행방법[4]에 준하여 진행하였다.

열안정성은 각이한 온도에서 효소를 푼 완충용액(pH 7.0)을 1h동안 방치하고 표준조건에서 나머지활성을 측정하는 방법으로, pH안정성은 각이한 pH의 완충용액에 효소를 1h동안 방치한 후 나머지활성을 측정하는 방법[5]으로 평가하였다. 효소활성 1U는 37℃에서 1min동안에 1ng의 p-니트로아닐리드를 생성하는 효소량으로 정의하였다.

효소활성이 최대가 되는 온도, pH조건에서 합성기질의 농도를 0.2부터 2.4mmol/L사이에서 변화시키면서 활성을 측정하고 라인위버-버크그래프로부터  $K_m$ 과  $V_{max}$ 를 결정하였다.[4]

재조합효소를 각종 무기염( $HgCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnCl_2$ ,  $FeCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $KCl$ )을 금속이온농도가 5mmol/L로 되도록 포함한 100mmol/L 트리스-염산완충용액(pH 7.0)에 희석하여 1h동안 방치한 다음 활성을 측정하는 방법으로 효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 평가하였다.

### 결과 및 논의

#### 1) 분자량결정

5% 농축겔, 12% 분리겔에서 SDS-PAGE를 진행하고 단백질분자량표식자들의 상대이동도와 분자량의 로그값사이관계그래프(그림 1)를 얻고 그에 기초하여 전기영동상에서

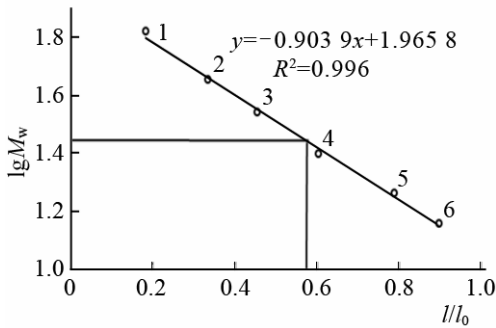


그림 1. 단백질분자량표식자의 상대 이동도와 분자량의 로그값사이 관계그래프  
1-6은 분자량이 각각 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 12.4kD인 경우

단일띠로 나타난 재조합피브린분해효소의 분자량을 계산한데 의하면 약 28kD였다.

## 2) 열안정성 및 온도에 따르는 효소활성변화

효소용액을 각이한 온도에서 1h 처리하고 나머지활성을 측정하여 재조합피브린분해효소의 열안정성을 평가하였다.(그림 2의 ㄱ))

그림 2의 ㄱ)에서 보는바와 같이 40℃까지는 피브린분해효소의 활성이 유지되고 50℃에서부터 감소되기 시작하여 65℃에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다. 재조합피브린분해효소는 55℃에서 최대활성을 나타내었으며 60℃이상부터는 활성이 급격히 떨어졌다.(그림 2의 ㄴ)) 37℃에서 피브린분해활성은 55℃에서 활성의 52%정도였다.

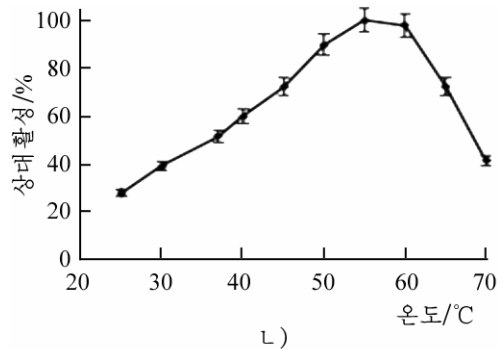
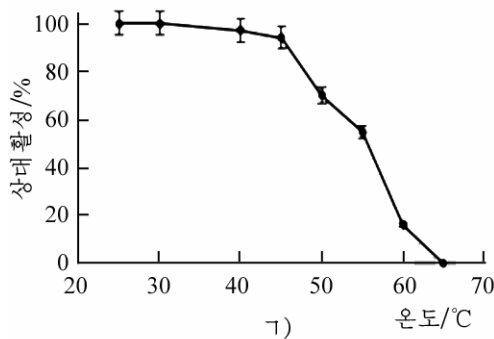


그림 2. 재조합피브린분해효소의 온도안정성(ㄱ)) 및 온도에 따르는 효소활성변화(ㄴ))

## 3) pH안정성 및 pH에 따르는 효소활성변화

효소의 pH안정성을 밝히기 위하여 각이한 pH의 완충용액에 효소를 첨가한 효소액을 25℃에서 1h동안 방치한 후 다시 pH 7.0으로 맞추고 나머지활성을 측정하였다. 재조합피브린분해효소의 pH안정성 및 pH에 따르는 효소활성변화는 그림 3과 같다.

그림 3의 ㄱ)에서 보는바와 같이 이 효소는 pH 6~11범위에서 자기의 활성을 유지하였으며 5.0이하 또는 11.0이상의 pH에서는 활성이 급격히 감소하였는데 이것은 효소활성중심의 구조가 변화되었거나 효소와 기질사이의 친화성이 낮아졌기때문이라고 볼 수 있다.

또한 효소활성은 pH 5.5에서부터 점차 증가하기 시작하다가 pH 9~10에서 최대로 되었으며 pH 10이상에서는 낮아졌다.(그림 3의 ㄴ)) 즉 이 효소는 pH 9~10에서 최대활성을 나타내는 알칼리성프로테아제라는것을 알수 있다. pH 7에서는 최대활성의 80%를 나타낸다.

재조합효소의 pH안정성 및 최적pH에 대한 연구결과는 *Bacillus subtilis natto*-89가 분비하는 천연효소의 특성과 일치한다.

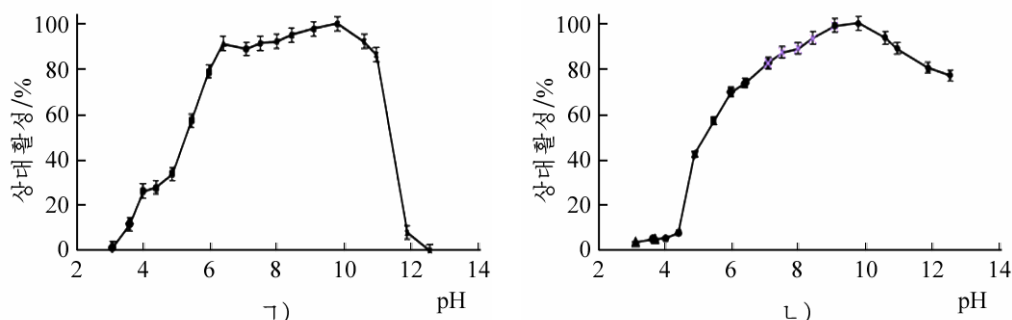


그림 3. 재조합피브린분해효소의 pH안정성(㉠) 및 pH에 따르는 효소활성변화(㉡)  
 pH 3~3.5: 0.2mol/L 글리신-염산완충용액, pH 3.5~5.9: 0.2mol/L 초산-초산나트륨완충용액,  
 pH 5.9~7.0: 0.2mol/L 트리스-초산완충용액, pH 7.0~9.0: 0.2mol/L 트리스-염산완충용액,  
 pH 9.0~12.0: 0.2mol/L 글리신-염화나트륨완충용액; 활성측정조건 37°C, 15min

#### 4) 효소반응운동학상수

합성기질의 농도를 0.2mmol/L와 2.4mmol/L 사이에서 변화시키면서 효소반응속도를 측정하고 라인위버-버크그래프를 작성한 결과는 그림 4와 같다.

그라프로부터 얻어지는 재조합효소의 합성기질에 대한  $K_m$ ,  $V_{max}$ 값은 각각 0.61mmol/L, 0.072mmol pNA/min으로서 선행연구[4, 5]에서 밝혀진 천연피브린분해효소의  $K_m$ ,  $V_{max}$ 값과 약간 차이난다. 일반적으로 같은 효소라고 하여도  $K_m$  및  $V_{max}$ 값은 아미노산조성에서의 약간한 차이나 활성측정조건의 차이에 의해서도 달라질수 있다.

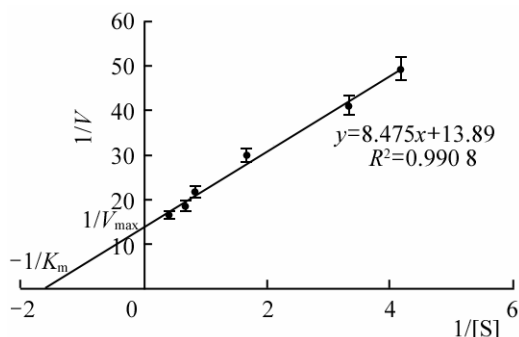


그림 4. 재조합피브린분해효소의 라인위버-버크그래프

#### 5) 효소활성에 미치는 금속이온의 영향

재조합피브린분해효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향은 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 피브린분해효소에 대하여  $Hg^{2+}$ 이 완전한 저해작용을 나타냈으며  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 은 일정한 정도의 저해작용을 나타냈다.  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ 은 피브린분해효소에 대하여 활성화작용을 나타내며  $K^+$ 은 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다. 피브린분해효소에 대한 금속이온들의 이러한 영향은 선행연구[4]에서 밝혀진 고초균피브린분해효소들의 특성과 일치하는것이다.

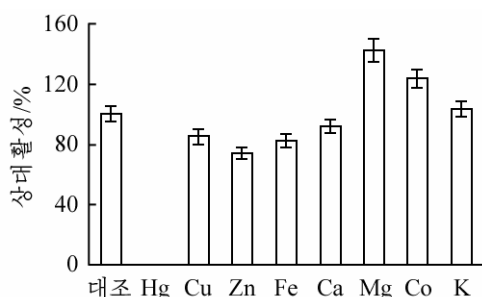


그림 5. 재조합피브린분해효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향

완충용액은  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $K^+$ 을 각각 5mmol/L 되게 포함하는 100mmol/L 트리스-염산완충용액(pH 7.0)이며 방치시간은 1h임.

재조합피브린분해효소와 천연피브린분해효소의 효소학적특성을 표에 종합하였다.

표에서 보는바와 같이 효모에서 발현되는 재조합피브린분해효소는 고초균에서 발현되는 천연효소와 효소학적특성이 기본적으로 일치한다.

이상의 결과로부터 진핵생물인 *Pichia pastoris*

표. 재조합피브린분해효소와 천연피브린분해효소의 효소학적특성[3, 5, 6]

구분	분자량 /kD	최적 온도 /°C	최적 /pH	$K_m$ /(mmol·L <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ /(mmol pNA·min <sup>-1</sup> )
<i>Pichia pastoris</i> GS115 (pPIC9K-proNK)	28	55	9~10	0.61	0.072
<i>B. subtilis</i> natto-89	—	60	10	—	—
<i>B. subtilis</i>	29.93	60	9	0.59	0.079
<i>B. subtilis</i> LD-8547	30	50	8	0.52	0.049
<i>Bacillus tequilensis</i>	27	45	10.5	—	—

GS115(pPIC9K-proNK)에서 발현되어 분비되는 재조합고초균피브린분해효소는 천연 효소와 효소학적특성이 일치하며 경구형혈전용해약물로서의 개발가능성을 가진다고 볼수 있다.

## 맺 는 말

재조합효모균그루 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)가 발현분비하는 재조합피브린 분해효소의 분자량은 약 28kD이며 효소활성이 최대로 되는 온도는 55°C, pH는 9~10이다. 분리정제한 재조합피브린분해효소에 대하여 5mmol/L의 농도조건에서  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ 이 활성화작용을 하며  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 은 저해작용을,  $Hg^{2+}$ 은 완전저해작용을 한다. 재조합피브린 분해효소의 합성기질에 대한  $K_m$ ,  $V_{max}$  값은 각각 0.61mmol/L, 0.072mmol pNA/min이다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보 생명과학, 64, 3, 84, 주체107(2018).
- [2] 리은성 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 5, 52, 주체106(2017).
- [3] A. M. Amira et al.; J. Pharm. Sci. & Res., 7, 2, 63, 2015.
- [4] C. T. Chang et al.; Food Chemistry, 133, 1611, 2012.
- [5] S. H. Wang et al.; World J. Microbiol. Biotechnol., 24, 475, 2008.
- [6] X. Xin et al.; Biotech., 90, 8, 1, 2018.

주체109(2020)년 7월 5일 원고접수

## Several Enzymatic Characteristics of the *Bacillus* Fibrinolytic Enzyme Expressed by Methanol Utilizing Yeast

Ri Un Song, Hyon Chol and Song Chang Il

The molecular weight of the recombinant fibrinolytic enzyme secreted by *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK) is 28kD and the temperature and pH at which the enzyme displays the maximum activity are 55°C and 9~10, respectively. At 5mmol/L concentration,  $Mg^{2+}$  and  $Co^{2+}$  activates the enzyme and  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  inhibits,  $Hg^{2+}$  deactivates the enzyme.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the recombinant enzyme on synthetic substrate are 0.61mmol/L and 0.072mmol pNA/min, respectively.

Keywords: fibrinolytic enzyme, *Pichia pastoris*, enzymatic characteristics