

## *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)가 분비하는 재조합피브린분해효소의 분리정제에 대한 연구

리은성, 현철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시기 질병과의 투쟁에서 중요한것은 심장혈관계통질병, 암성질병, 물질대사질병을 비롯하여 병걸린률과 노동능력상실률이 높은 질병을 미리막기 위한 대책을 바로세우는것입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 72페이지)

경구용혈전용해제인 《청곡키나제》의 생산성과 그 효과성을 높이는것은 뇌혈전증을 비롯하여 발병률과 사망률이 높은 심장혈관계통질병들을 미리막고 치료하는데서 중요한 의의를 가진다. 우리는 《청곡키나제》의 생산성을 높이기 위하여 *Bacillus subtilis natto*-89의 피브린분해효소를 발현분비하는 효모균주 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)체계를 구축[1]한데 이어 그 배양액으로부터 재조합피브린분해효소를 분리정제하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

균주로는 *Bacillus subtilis natto*-89의 피브린분해효소유전자가 재조합된 효모균주 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)[1]를 리용하였으며 종균배지로는 YPD배지를, 초기배지로는 BMGY배지를, 유도배지로는 BMMY배지를 리용하였다. 크로마토그래프법에서의 담체로는 세파덱스 G-100(《Pharmacia》)과 DEAE섬유소(《Whatman》)를 리용하였으며 이외에도 기타 무기시약들(분석순)을 리용하였다. 효소활성측정을 위한 합성기질로는 S-7388(N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide, 《Aladdin》)을 리용하였다.

분리정제는 다음의 방법으로 하였다. 메타놀유도효모균배양상청액을 류산암모니움 70% 포화도에서 염석을 진행하고 4℃에서 하루밤동안 투석하였다. 투석시료를 50mmol/L의 린산완충용액(pH 7.0)으로 미리 평형화한 세파덱스 G-100탑( $\phi$  1.5cm×50cm)에 적재하고 같은 완충용액 120mL를 8mL/h의 속도로 통과시키면서 분획들을 수집하였다. 활성분획을 0.2mol/L의 글리신-수산화나트륨완충액(pH 10.0)으로 평형화한 DEAE섬유소탑( $\phi$  1.5cm×12.5cm)속으로 20mL/h의 속도로 통과시켜 효소단백질을 흡착시켰다. 다음과 같은 완충용액으로 충분히 씻고 0~0.5mol/L의 NaCl용액으로 용출(용출체적 100mL, 용출속도 20mL/h)시켰다. 모든 분리정제조작은 4℃에서 진행하였다.

효소활성은 합성기질분해활성측정법[2, 5]으로 측정하였다.

### 결과 및 논의

배양액을 원심분리하여 상청액(pH 7.6)을 4℃에서 보관하면서 보관기일에 따르는 효소활성변화를 보았다.(표 1)

표 1. 보관기일에 따른 효소활성변화

보관기일/d	1	2	3	4	5	6	7
상대활성/%	100	97.3	97.1	96.9	96.8	96.8	96.0

표 1에서 보는바와 같이 배양액상태에서 효소는 4°C에서 보관 2일만에 약간의 활성 감소가 있었으나 보관 7일까지 96%이상의 활성을 보존하였다. 이로부터 우리는 배양액으로부터 재조합효소의 분리정제과정이 7일을 넘지 않는 조건에서 보관기일이 효소의 거동률에 영향을 미치지 않는다는것을 알수 있었다.

이와 같은 결과에 기초하여 재조합효모균배양액으로부터 효소를 분리정제하기 위한 연구를 하였다.

먼저 재조합효모균배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 상청액을 70% 포화도에서 류산암모니움염석한 후 4°C에서 하루밤동안 증류수로 투석을 진행하였다. 투석시료에 대하여 세파덱스 G-100겔크로마토그래프법을 적용하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 1개의 큰 단백질봉우리와 2개의 작은 봉우리가 나타났으며 마지막봉우리에 해당하는 용출체적(78~96mL)에서 효소활성봉우리가 나타났다. 다른 단백질 봉우리에 해당하는 분획에서는 효소활성이 나타나지 않았다.

용출체적 78~96mL에 해당하는 시료를 수집하여 류산암모니움염석법으로 농축하고 투석한 다음 DEAE섬유소탐이온교환크로마토그래프법을 적용하였다.(그림 2)

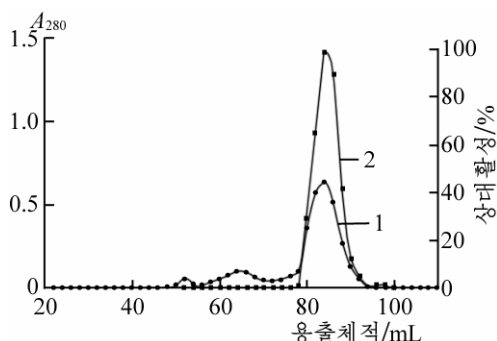


그림 1. 투석시료의 세파덱스G-100겔크로마토그램  
탐크기  $\phi$  1.5cm $\times$ 50cm, 용출속도 8mL/h,  
분획체적 2mL; 1-A<sub>280</sub>, 2-상대활성

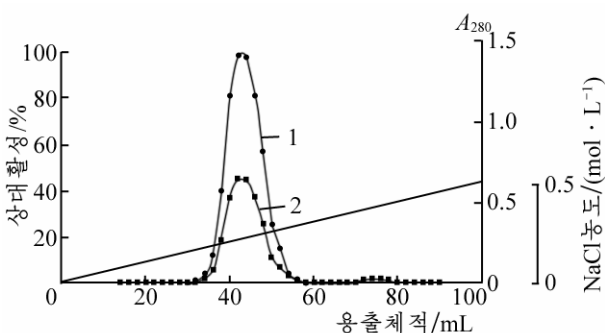


그림 2. DEAE섬유소탐이온교환크로마토그램  
탐크기  $\phi$  1.5cm $\times$ 12.5cm, 용출속도 20mL/h,  
분획체적 2mL; 1-상대활성, 2-A<sub>280</sub>

그림 2에서 보는바와 같이 NaCl농도 0.21~0.32mol/L에서 기본단백질봉우리가 나타났으며 0.36~0.41mol/L에서 약간한 단백질봉우리가 나타났다. 효소활성봉우리의 위치는 첫번째 단백질봉우리와 완전히 일치하였으며 두번째 단백질봉우리에서는 효소활성이 나타나지 않았다.

분리정제단계별 시료에 대한 SDS-PAGE상(그림 3)을 통하여 목적단백질이 비교적 순수하게 정제되었다는것을 확인하였다.

그림 3을 통하여 류산암모니움염석(70% 포화도), 세파덱스

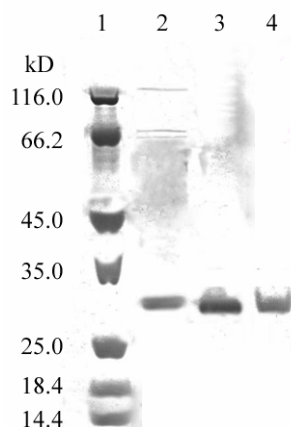


그림 3. 정제한 재조합피브리노분해효소의 SDS-PAGE상  
1-단백질분자량표식자, 2-배양상청액, 3-세파덱스 G-100겔여과크로마토  
그래프활성분획, 4-DEAE섬유소이온교환크로마토그래프활성분획

G-100겔크로마토그래프법, DEAE섬유소이온교환크로마토그래프법의 3단계를 거쳐 재조합 피브리노분해효소가 배양액으로부터 순수하게 정제된다는 것을 알 수 있다.

분리단계별 정제도와 거둠률은 표 2와 같다.

표 2. 정제단계별 정제도와 거둠률

정제 단계	단백질량/mg	총활성/( $\times 10^5$ U)	비활성/( $\times 10^5$ U·mL <sup>-1</sup> )	정제도	거둠률/%
배양액	75.0	140.0	1.86	1.00	100.0
류산암모늄염석	46.8	100.8	2.15	1.16	72.1
세파덱스 G-100겔 크로마토그래프법	18.8	47.3	2.52	1.35	33.8
DEAE섬유소이온교환 크로마토그래프법	10.6	29.8	2.81	1.51	21.3

표 2에서 보는바와 같이 재조합피브리노분해효소는 출발효소용액으로부터 70% 류산암모늄염석, 세파덱스 G-100겔러파크로마토그래프법, DEAE섬유소이온교환크로마토그래프법을 거쳐 21.3%의 거둠률로 1.51배 정제되었다.

피브리노분해효소를 천연고초균배양액으로부터 순수하게 분리하기 위한 연구과정에 한 연구자는 3단계의 분리정제공정을 거쳐 19배[3], 다른 연구자는 3단계의 분리정제공정을 거쳐 200배 정제[4]하였다. *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)균주배양액으로부터의 효소 분리정제과정에 정제도가 낮은 것은 유전자재조합으로 인한 목적단백질의 생성량증가와 함께 기타 잡단백질을 발현분비하지 않는 *Pichia pastoris*균주의 우월한 특성에 의한 것이다. 배양상청액속에 잡단백질이 섞여있는데 이것은 효모세포가 정상기를 거치면서 진행되는 자가분해과정에 세포내단백질이 배양액속에 배출되어 생긴 단백질이라고 볼 수 있다.

## 맺는 말

*Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)가 발현분비하는 재조합피브리노분해효소는 70% 류산암모늄염석, 세파덱스 G-100겔러파크로마토그래프법, DEAE섬유소이온교환크로마토그래프법을 거쳐 21.3%의 거둠률로 1.51배 되게 SDS-PAGE적으로 순수하게 정제되었다.

## 참고 문헌

- [1] 리은성 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 5, 52, 주체106(2017).
- [2] C. T. Chang et al.; Food Chemistry, 133, 1611, 2012.
- [3] J. B. Kim et al.; Biotechnol. Lett, 29, 605, 2007.
- [4] S. B. Kim et al.; Tempeh. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33, 436, 2006.
- [5] T. T. Nguyen et al.; Microbial Cell Factories, 12, 1, 2013.

## **Purification of Recombinant Fibrinolytic Enzyme from *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-proNK)**

*Ri Un Song, Hyon Chol*

Recombinant fibrinolytic enzyme is purified with 1.51 fold in enzyme purity and 21.3% in recovery through 3 steps of purification including 70% ammonium sulfate precipitation, sephadex G-100 chromatography and DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

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