

재조합메타놀동화효모균그루로부터 α -N-아세틸 갈락토자미니다제를 분리하기 위한 연구

남창길, 림복남, 리경호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학, 화학을 발전시키는것은 인민들의 먹고 입는 문제를 비롯하여 인민생활을 높이는데서 매우 중요한 의의를 가집니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487페이지)

우리는 이미 제작한 α -N-아세틸갈락토자미니다제(α -NAGA)생성 재조합메타놀동화효모를 리용하여 효소생성을 위한 고밀도배양조건과 배양액으로부터의 효소분리조건을 검토하였다.

재료 및 방법

α -NAGA생성재조합효모균그루로 *Pichia pastoris* GS115(*naga*)를 리용하였다. 배양장치로서 생물반응기(《BIOFLO 3000》)를 리용하였으며 종자배양에는 BMGY배지를, 고밀도배양에는 BSM배지를 리용하였다. 효소분리담체로는 양이온교환능력이 높은 Macro Prep High S(《BIO-RAD》)를 리용하였다.

주기배양은 선행방법[1]에 준하여 진행하였으며 효소활성분석은 기질로 *p*-니트로페닐-*N*-아세틸갈락토자미니드를 리용하여 선행방법[2]에 준하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) α -NAGA유전자발현을 위한 재조합효모의 고밀도배양조건검토

선발된 균그루 *Pichia pastoris* GS115(*naga*)를 리용하여 효모고밀도배양을 진행하였다. pH

5.0, 온도 28℃ 조건에서의 배양시간에 따르는 균체생질량과 효소활성의 변화곡선은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 배양 30h(유도후 6h)만에 균체생질량은 300g/L에 달하였는데 이것은 균그루가 기초무기염배지에서 자기의 정상증식을 보장한다는것을 의미한다. 효소활성은 유도후 19h만에 2.86U/mL로서 제일 높았다.

배양단계별에 따르는 균체비증식속도, 균체거듭률, 균체기질소비속도를 조사한 자료는 표 1과 같다.

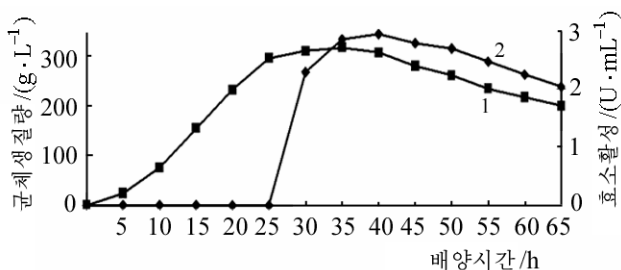


그림 1. 고밀도배양단계별 배양시간에 따르는
균체생질량과 효소활성

1—균체생질량, 2—효소활성

표 1. 고밀도배양단계별 균체비증식속도, 균체거둠률, 기질소비속도

파라메터	배양단계		
	글리세린 주기식배양	글리세린 첨가배양	메타놀 유도배양
균체비증식속도/(h ⁻¹)	0.110	0.086	0.011
균체거둠률	0.990	0.650	0.194
기질소비속도/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.166	0.703	0.284

유도시간에 따르는 효소발현에 관한 SDS-폴아겔전기영동 분석을 진행한데 의하면 배양시간 19h까지 효소발현량이 증가하였다.(그림 2)

2) 재조합닭간기원 α -N-아세틸갈락토자미니다제의 분리정제
재조합효모의 배양상청액으로부터 재조합닭간기원 α -N-아세틸갈락토자미니다제에 대한 분리정제를 진행하였다.

먼저 α -NAGA의 등전점과 최적흡착pH를 고려하여 양이온 교환담체에서 완충액의 pH에 따르는 흡착특성을 검토한데 의하면 완충액의 pH가 4.5일 때 효소단백질 흡착량이 가장 많았으며 용리되는 효소량도 많았다. 이와 같은 실험결과에 기초하여 우리는 효소분리정제공정을 그림 3과 같이 설계하고 효소분리정제를 진행하였다.

분리정제결과 α -NAGA는 150~200min사이에서 거의 용출되었으며 효소거둠률은 31.3%, 정제도는 178배, 마감효소제제의 비활성은 25U/mg이었다.(그림 4, 표 2)

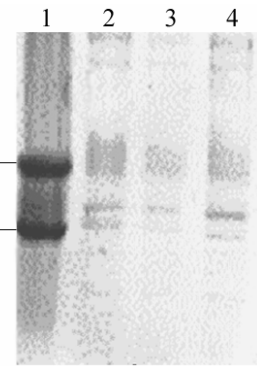


그림 2. α -NAGA 유전자재조합 효모고밀도배양액의 SDS-PAGE상

1-단백질분자량표식자, 2-메타놀유도 6h, 3-메타놀유도 10h, 4-메타놀유도 19h

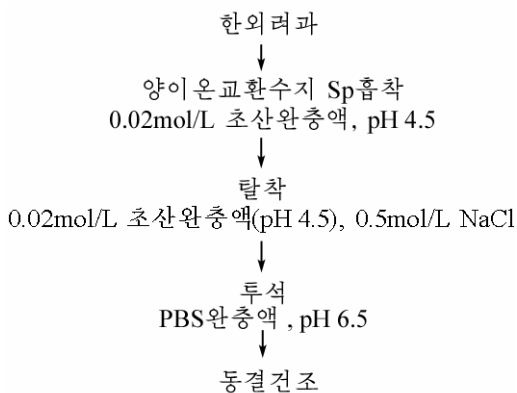


그림 3. 재조합효모배양상청액으로부터 α -NAGA의 분리정제공정

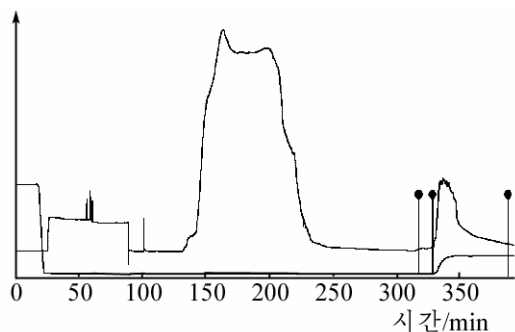


그림 4. α -NAGA에 대한 Macro Prep High S 양이온교환담체크로마토그래프

표 2. 재조합닭간기원 α -NAGA에 대한 분리정제표

단계	체적/mL	단백질량/mg	총활성/U	비활성/(U·mg ⁻¹)	정제도/배	거둠률/%
배양액	800.0	4 508	640.0	0.14	1	100.0
한외려과농축	60.0	84	422.4	5.01	35	66.0
Sp이온교환크로마토그래프	45.0	14	201.6	14.20	101	31.5
동결농축	1.2	8	200.0	25.03	178	31.3

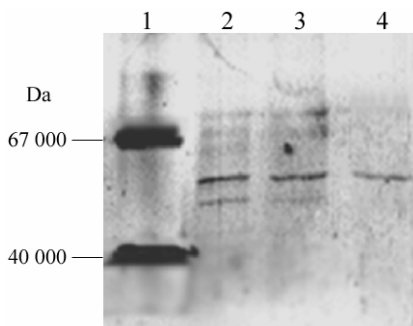


그림 5. 닭간기원 α -NAGA의 분리 단계별 SDS-PAGE상
1—분자량표식자, 2—배양액, 3—한외
여과농축액, 4—Sp용출액

닭간기원 α -NAGA의 분리단계별 SDS-PAGE상을 그림 5에 보여주었는데 양이온교환크로마토그래프의 활성분획들에서는 거의 단일띠로 검출되었으며 영동상에 대한 덴시토미터분석결과 효소의 상대함량은 95%였다.

3) 재조합닭간기원 α -N-아세틸갈락토자미니다제에 의한 A형혈액의 O형으로의 전환

우리는 얻어진 닭간기원 α -NAGA를 리용하여 A형혈액을 O형으로 전환시키기 위한 실험을 진행하였다. A₂B아형적혈구에 재조합닭간기원 α -NAGA를 작용시킨 결과 (PCBS완충액, 효소농도 100U/mL 농적혈구, 26°C, 1h) A₂항원이 제거되어 항A항체에 대한 응집이 일어나지 않았다.(그림 6)

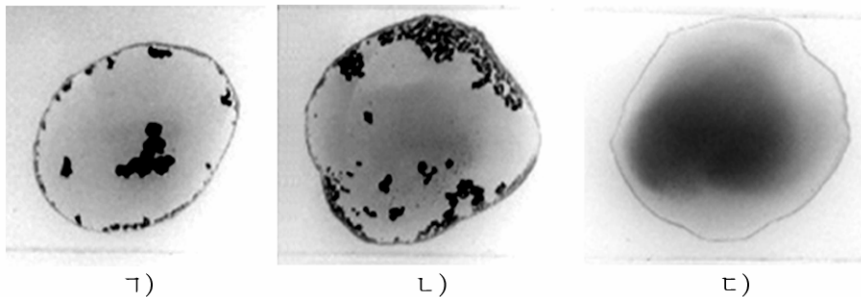


그림 6. α -NAGA로 처리한 적혈구와 단클론항A항체와의 반응상
ㄱ) A₂B아형적혈구+항A(대조1)항체, ㄴ) A₂B아형적혈구+ α Gal+항A항체(대조2),
ㄷ) A₂B아형적혈구+ α -NAGA+항A항체

맺는 말

1) pH 5.0, 온도 28°C의 조건에서 고밀도배양을 진행한 결과 메타놀유도배양 6h만에 균체생질량은 300g/L였으며 19h만에 효소활성은 2.86U/mL였다.

2) 확립한 분리정제공정에서 효소거둠률은 31.3%, 정제도는 178배, 비활성은 25U/mg였다.

3) 분리정제된 재조합닭간기원 α -N-아세틸갈락토자미니다제는 사람 A₂아형적혈구의 항원을 분해하여 O형으로 전환시켰다.

참고 문헌

- [1] H. K. David et al.; Journal of the American Chemical Society, 137, 5695, 2015.
- [2] Alex Zhu et al.; Protein Expression and Purification, 8, 456, 1996.

Purification of Recombinant α -N-Acetylgalactosaminidase from Methanol Assimilation Yeast Strain

Nam Chang Gil, Rim Pok Nam and Ri Kyong Ho

Recombinant strain *Pichia pastoris* GS115(*naga*) was cultured by using bioreactor and α -N-acetylgalactosaminidase was purified by using cation exchanged chromatograph from culture media. The purified α -N-acetylgalactosaminidase converted human blood group A₂ to O.

Key words: recombinant α -N-acetylgalactosaminidase, methanol assimilation yeast, purification