

# rDNA 産物の 精製技術

李 承 基

(서울大藥大 教授)

## 1. 序 論

유전자재조합기술이 개발된 이후에 미생물과 고등생물 전역에 걸쳐 많은 유전자가 분리되어 그 구조 및 발현조절기전에 대하여 많은 이해를 할 수 있게 되었다. 따라서 종전에는 불가능했던 고등생물의 여러가지 유용한 생리활성 물질의 대량생산이 미생물 또는 효모등을 숙주세포로 하여 가능하게 되었다. 이들 遺伝工学応用製品의 産業化를 爲해 최근들어 rDNA 産物の 工業的生産을 爲한 발효공정이 unit operation 으로서 중요성이 가중되고 있다. 아울러 이들 발효산물의 downstream processing 기술의 새로운 개발은 遺伝工学応用製品의 상품으로서 시장성을 좌우하는데 직결되어 있다는데 인식이 새로워지고 있다.

Downstream processing의 중요성은 Genentech社의 「1984년도 연례보고서」를 보면 잘 나타나 있는데 본 보고서는 “새로운 제품을 연구실에서 창조하는 것은 첫번째 관문이지만 제품이 정제되어 제품화 되는 과정에 비하면 이 첫번째 관문은 겨우 시작단계에 지나지 않는다”라고 할 정도로 크게 강조하였다. 최근에 열렸던 Biotech 84 congress에서도 rDNA 기술을 이용한 산물의 발효공정 이후의 downstream processing에 대한 중요성이 강조되었고 종래 사용되어온 정제기술의 공업적 응용에 관한 경제성 및 응용의 한계성 때문에 여러가지 새로운 downstream processing 기술에 대해 검토된 바 있다(Biotech 84, 1984). 최근들어 점차로 많은 수의 의약품들이 rDNA 조작기술에 의해 공업적 규모로 생산되어 downstream 단계를 거쳐 제품화 되어 FDA의 승인을 얻게되는 과정에 들어가 있는 것을 볼 수가 있다. 소위 “low

volume, high value”의 의약품들 특히 vaccine 제제, 홀몬제제, 항바이러스약품, 치료용효소제, 혈장단백 및 면역조절인자등은 대규모의 정제를 거쳐야 되는 것으로 downstream processing의 중요성이 강조되는 제품들이다. 특히 이들 의약품들을 bacteria를 host로 하여 생산할 때 소위 ppm단위의 오염도 심각한 문제를 일으킬 수 있는 pyrogenic lipopolysaccharide 와 endotoxin의 제거가 절대적으로 요구되므로 신속하고도 효율적이며 고순도의 제품을 생산할 수 있는 정제기술의 개발은 제품의 시장화를 결정짓게 할 수 있는 매우 중요한 단계라고 하겠다.

rDNA 기술은 크게 나누어 두 종류의 생물학적 제제를 생산하는데 이용되고 있다. 첫째는 생리활성을 갖는 단백질로서 이들 단백을 coding 하는 gene을 숙주세포에 clone하여 고농도의 단백을 생성시키는데 rDNA 기술을 응용하며, 둘째는 primary 또는 secondary metabolite들 즉 아미노산들이나 항생제들을 생산하는 균주의 생산성을 향상시키기 위해 rDNA 기술이 이용되고 있다. 후자의 생성물은 일반적으로, 세포외로 분비가 되기 때문에 봉쇄조작(containment)을 해야한다는 제약 외에는 종전에 사용되어온 정제기술을 사용할 수 있겠다. 전자의 경우 발효산물의 회수는 효소나 insulin등과 같은 생리활성 단백을 정제하는데 사용되는 여러가지 정제방법을 사용할 수 있는데 발효산물이 일반적으로 세포내에 존재하기 때문에 공업적 규모에서 발효산물의 추출 그리고 이들 추출물에서 원하는 특정단백을 분리하여 고순도로 정제하기 위해 새로운 high resolution 기술들이 개발되고 있다. 예를 들면 immunoaffinity chromatography, HPLC 및 고압에서 신속하게 분리될 수 있게 해주는 새로운 chromatogra-

phic media (FPLC) 등이 서둘러 개발되고 있는데 본문에서는 최근에 개발되고 있는 새로운 high resolution 기술을 중심으로하여 경제성 있는 고순도의 rDNA 산물의 회수 방법에 대하여 토론하고자 한다. 또한 이들의 정제 방법에 의한 rDNA 산물의 회수에 대한 한계성을 검토하고 최근에 활발히 개발되고 있는 rDNA 조작에 의해 발효산물의 추출 및 정제를 용이하게 해 줌으로 고수득율과 고순도의 회수를 가능하게 해주는 “upstream processing” 기술과 정제 기술의 併用방법에 관하여 집중적으로 토론하고자 한다.

## 2. Downstream Processing의 범위

Downstream processing은 Fig. 1에 도시한 바와 같이 제 1 단계는 사용된 배양액으로부터 cell의 분리, 분쇄, 그리고 목적물과 cell debris의 분리등 “primary recovery”로 구성되며 제 2 단계로는 이들 cell extract로부터 high resolution 정제과정을 거쳐 고순도의 산물을 회수하는 “product work-up” 단계로 구분되어

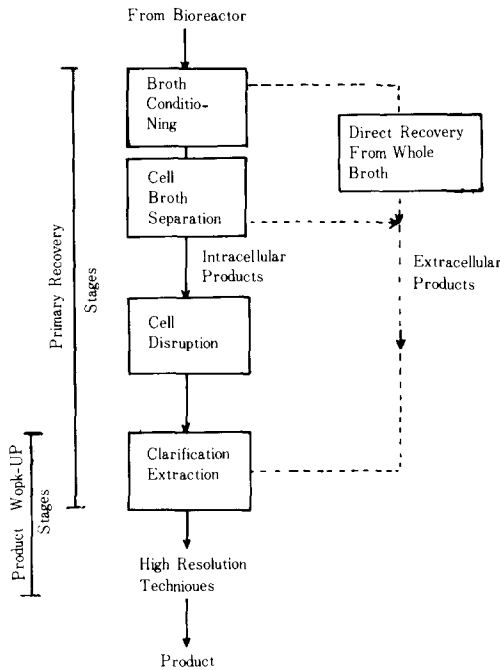


Fig. 1. Classification of downstream processing.

Table 1. Separation of Bacterial Cells and Fragments.

| 1st stage:                   |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| Centrifuge:                  | AX 215                |
| Solids content in feed:      | 7% by volume          |
| Troughput:                   | 3 m <sup>3</sup> /h   |
| Solids recover               | >99%                  |
| Duty: Removal of cell debris |                       |
| 2nd stage:                   |                       |
| Centrifuge:                  | AX 215                |
| Solids content in feed:      | 5% by volume          |
| Troughput:                   | 1.5 m <sup>3</sup> /h |
| Solids recovery              | >99%                  |

진다. 고순도의 산물을 높은 수득율로 얻기 위하여 첫번째 단계인 primary recovery 과정은 매우 중요하기 때문에 cell-broth분리, cell의분쇄, cell debris 및 오염물질의 제거등 각 공정 단계를 최적조건으로 맞춰주므로 신속하고 효과적인 목적물의 회수는 필수요건이라 하겠다.

본 토론에서는 고순도의 product를 높은 수득율로 얻기 위하여 개발된 여러가지 기술과 현재 시도되고 있는 방법등을 중심으로 downstream processing의 각 단계별로 설명하고자 한다.

## 3. Primary Recovery단계

Downstream의 첫번째 단계이며 핵심적인 조 작단계로 culture media로부터 cell의 분리, cell debris의 제거, precipitate의 수집 및 adsorbents의 회수등을 들 수 있는데 이를 위해 원심분리와 여과방법이 주종을 이루고 있다. 원심분리 방법으로 15,000×g의 공업적 규모의 분리가 고안되어 실용화되고 있고 최근에는 contineous operating centrifugal separator를 많이 사용하고 있는데 여러 종류의 미생물들의 회수를 최적화 시키기 위해 여러가지의 다양한 형태와 크기로 고안된 centrifugal separator들이 개발되어 yeast의 경우 200m<sup>3</sup>h<sup>-1</sup>로 E. coli의 경우 3m<sup>3</sup>h<sup>-1</sup>의 속도로 발효 배양

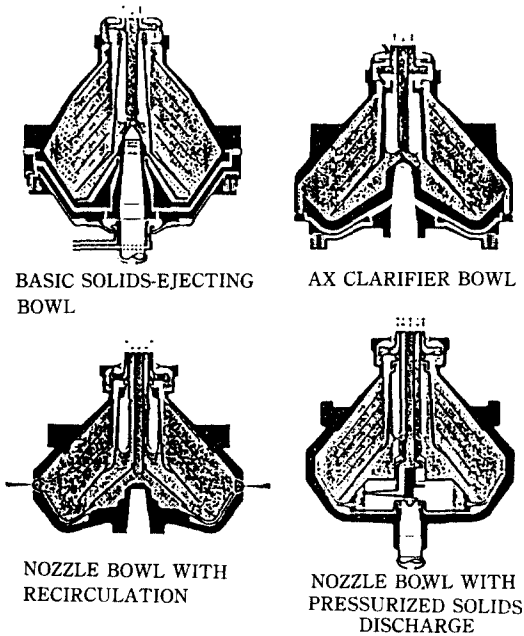


Fig. 2. Continuous operating centrifugal Separator.

액을 처리할 수 있게 되었다(Table 1).

분리하고자 하는 미생물의 종류와 크기에 따라 여러 형태의 원심분리기들이 고안되어 있는데 예를 들면 Fig. 2에 도시된 바와 같이 Basic

solids-ejecting bowl, Ax clarifier bowl, Nozzle bowl with recirculation 등이 고안되었는데 특징은 연속적으로 배양액을 주입시키면서 cell과 broth의 분리를 할 수 있도록 설계되어 있으며 요즈음 실용화되고 있는 분리기의 종류와 이들에 의해 분리될 수 있는 미생물의 종류를 표시하면 Table 2와 같다.

원심분리방법 대신에 현재 많이 연구되고 있고 실용화 단계에 들어선 기술로 microporous 막을 이용한 cross-flow 또는 tangential-flow filtration 방법이 있다. 이 방법들은 입자의 크기가 매우 적고 배양액과 입자 사이에 밀도 차이가 거의 없을 때 원심분리 방법으로는 분리가 어려운데 이들 여과방법으로 쉽게 분리할 수 있기 때문에 응용도가 많이 기대되는 기술로 평가 받고 있다.

일단 분리된 cell로부터 목적물을 추출하고 회수하는 과정 중에서 회수율에 가장 영향을 크게 미치는 것이 단백질 분해효소의 역할인데 이들 효소의 작용을 억제 또는 제거시키기 위해 사용되는 방법으로, 첫째로는 protease inhibitor를 사용하는 방법이다. 예를 들면 PM-SF (phenylmethyl sulfonyl fluoride) 또는

Table 2. Biomass Separation

| PRODUCT       | MICROORGANISM |                | RELATIVE THROUGHPUT INCENTRIFUGE | TYPE OF SEPARATOR          |
|---------------|---------------|----------------|----------------------------------|----------------------------|
|               | TYPE          | SIZE (microns) |                                  |                            |
| Bakers yeast  | Saccharomyces | 7 - 10         | 100                              | NOZZLE                     |
| Brewers yeast | Saccharomyces | 5 - 8          | 70                               | NOZZLE                     |
| Alcohol yeast | Saccharomyces | 5 - 8          | 60                               | SOLIDS EJECTING            |
| SCP           | Candida       | 4 - 7          | 50                               | NOZZLE, DECANTER           |
| Antibiotics   | Mould         | -              | 10 - 20                          | DECANTER                   |
| Antibiotics   | Actinomyces   | 10 - 20        | 7                                | SOLIDS EJECTING            |
| Cirtic acid   | Mould         | -              | 20 - 30                          | SOLIDS EJECTING DECANTER   |
| Enzymes       | Bacillus      | 1 - 3          | 7                                | NOZZLE SOLIDS EJECTING     |
| Vaccines      | Clostridia    | 1 - 3          | 5                                | SOLID BOWL SOLIDS EJECTING |

DFP (diisopropylfluoro phosphate) 가 있는데 DFP가 PMSF 보다 효과가 우수하지만 독성 문제로 공업적 규모로는 사용할 수 없고 PMSF 가 사용된다.

둘째 방법으로는 hydrophobic chromatography (예를 들면 octyl-sepharose CL-4B) 를 이용하여 효모 또는 *E. coli* 에서 단백분해 효소의 활성을 50% 이상 쉽게 제거 (Hedman, 1983) 할 수 있었는데 세포로부터 추출한 후 초기단계에 공업적 규모로 단백분해 효소를 쉽게 제거할 수 있는 방법으로 응용도가 기대되는 방법이다.

세째번 방법으로 단백분해 효소에 의한 단백분해를 막는 방법으로 Kleid (1981) 등은 190 개의 아미노산을 coding 하는 trp LE 유전자의 일부에 FMDV 바이러스의 immunogenic capsid protein VP1의 유전자를 융합시킨 후 *E. coli* 에서 virus-trp LE 혼성단백을 생성시켰는데 이 단백질은 물에 불용이기 때문에 단백분해 효소로부터 보호할 수 있다는 것을 밝혀냈다. 또한 이 방법은 대부분의 용해성 단백질로부터 불용성 혼성단백을 분리 정제하기가 용이하여 전기영동에 의해 2 차로 정제한 후 직접 immunogen으로 사용할 수 있을 정도로 순도가 높았다고 보고된 바 있다.

네째로 개발되고 있는 방법으로 protease-deficient strain 을 이용하는 방법인데 최근에 peptidase deficient yeast strain 을 이용하여 효과적이고 높은 수득율의 human  $\alpha_1$ -antitrypsin 을 얻은 예 (Cabezon 등, 1984) 로 봐서 특히 단백질효소에 sensitive 한 product 의 회수율을 높이기 위해 유용하게 응용할 수 있는 방법이다.

#### 4. Product Work-up 단계

Cell homogenate로부터 목적물의 회수를 효과적이고 높은 수득율로 産物을 분리하기 위해 최근에 개발되어 실용화되고 있는 방법을 중심으로 검토하면 다음과 같다.

4-1. Aqueous two phase system 을 이용하여 carrier adsorbent에 의한 product 의 회수방법

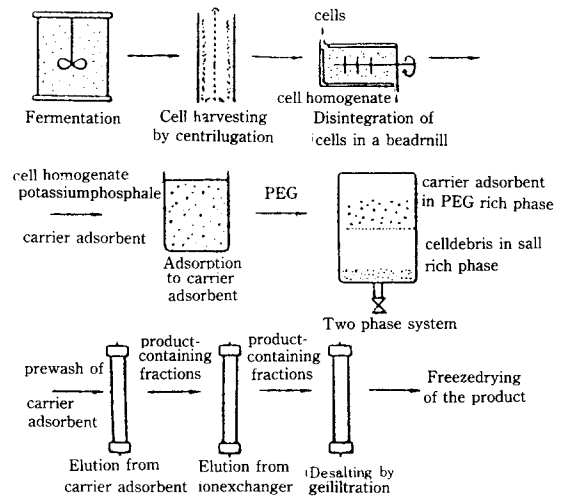


Fig. 3. Overall scheme for recovery of  $\beta$ -galactosidase.

Cell homogenate로부터 효과적인 product의 회수를 위해 Hedman's group (1983) 은 aqueous 2 phases extraction system 을 이용 phenyl-sepharose CL-4B를 adsorbent로 하여 less polar한 PEG-rich phase와 partition 시킴으로 효율적이고도 신속하게 product의 회수를 하였는데 이는 추출된 product가 cell debris와 재결합하는 것을 막고 proteolytic breakdown을 최소화시킨 결과이다.

특히 hydrophobic interaction chromatography에서는 low ionic strength에서 product를 elution 시킴으로 다음 단계에서 ion exchange chromatography를 직접 할 수 있는 장점이 있다.

이 방법을 이용하여  $\beta$ -galactosidase를 생성하는 *E. coli* strain (A-324-5)에서  $\beta$ -galactosidase를 회수하여 (Frej 등, 1984) 85%의 높은 수득율과 고순도의 효소를 생산한 것을 예로 소개하면 다음과 같다.

$\beta$ -galactosidase 회수를 위한 조작은 Fig. 3에 도시된 바와 같다. 즉 100 l의 fermentor에서 succinate를 carbon source로 하여 minimal medium에서 배양후 592g의 cell을 얻었고 (tubular bowl centrifuge (CEPA 41)를 이용하여 cell-medium을 분리하였음), bead mill (Dyno-Mill KDL)를 통과시킴으로 세포를 파

피하고 phenyl-sepharose CL-4B (187 g), potassium phosphate (686 g) 그리고 증류수 (532 g) 을 cell homogenate (1,504 g)에 직접 가해 1 시간 동안 방치시켜 효소를 carrier adsorbent에 흡착시킨후 polyethylene glycol (PEG) 4,000 (569 g), potassium phosphate (722 g) 그리고 증류수 (3,759 g) 를 가하여 최종 혼액의 각 성분의 농도를 다음과 같이 형성시켰다.

|   |          |
|---|----------|
| The final composition of the mixture was: |          |
| PEG 4,000                                 | 6 g w/w  |
| potassium phosphate                       | 14 g w/w |
| phenyl sepharose CL-4B                    | 20 g w/w |
| <i>E. coli</i> cell material              | 6 g w/w  |
| water                                     | 54 g w/w |

Phase separation을 위해 원심분리 (1,000 × g, 1~2분)를 한후 상부층에 있는 (PEG rich-phase) carrier adsorbent로부터 효소를 분리하고 DEAE sepharose(fast flow)와 sephadex G-25를 이용하여 효소를 정제하여 85%의 고수득율을 얻게 되었는데 공업적 회수방법으로 매우 경제성이 높은 방법으로 많이 사용되는 방법이다.

#### 4-2. 침전방법에 의한 Protein의 회수

본 회수방법은 식품단백 또는 효소단백을 공업적으로 얻는데 실제로 많이 사용되는 방법으로, 목적으로 하는 단백질의 생화학적 기능을 유지하면서 어떤 특정 contaminating protein을 최대한으로 제거시키므로 다음 정제단계에서 용이하게 목적으로 하는 단백을 회수할 수 있게 하는데 주목적이 있는 회수 방법이다. 본 회수 방법은 4개의 main unit operation으로 구성돼 있는데, 첫째는 precipitating agent와 단백질의 접촉과정으로 batch, continuous stirred tank 나 continuous tubular reactor 등이 이용되며, 둘째는 침전반응의 효과를 높이기 위한 ageing step, 셋째는 침전물을 separator로 이동시키는 과정, 넷째는 원심분리를 이용한 침전물의 회수등으로 나눌 수 있겠다.

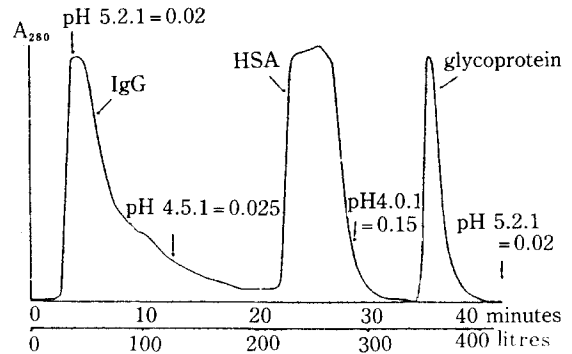
Precipitating agent로 많이 사용되는 것은 salting-out 효과를 이용한 ammonium sulfate

를 이용하거나, isoelectric precipitation을 이용한 mineral acid등이 사용되나 mineral acid의 사용은 경제성은 전자에 비해 좋은 반면 단백질과 접촉시 단백질구조를 변화시켜 denaturation을 시키는 단점이 있으나 최근에 농황산을 사용하여 mixing condition을 조절하므로 (turbulent flow를 조절하므로) denaturation되는 정도를 저하시켜 효소활성이 높은 alcohol dehydrogenase를 회수 (Hoare and Dunnill, 1984) 할 수 있던 점으로 미루어 이 방법의 공업적 응용에 관심을 끌고 있다.

#### 4-3. Chromatography에 의한 product의 정제방법

##### 4-3-1. Ionexchange chromatography에 의한 정제방법

생화학 연구실험실에서 가장 널리 사용되는 정제기술로서 생물공학의 영향을 받아 공업적 응용을 위한 새로운 이온교환 수지가 개발되고 있다. Shoemaker (1983) 등은 exo-cellobiohy-



Column: Sephamic Gel Filter GF 08-015.

80 cm Ø × 15 cm L, V, 75 litres

Gel: DEAE-Sephacrose Fast Flow

Flow rate: 10 litres. min<sup>-1</sup>, 2 ml. cm<sup>-2</sup>. min<sup>-1</sup>, 8 V., h<sup>-1</sup>

Pressure: 75 kPa, 0.75 bar, 10.5 lbs. in<sup>-2</sup>

Buffers: Sodium acetate

Cycle time inc. regeneration: 60 min.

Capacity:

Total protein processed: 4.5 kg. h<sup>-1</sup>

Where of albumin: 2.3 kg. h<sup>-1</sup>

Equivalent plasma volume: 75 litres. h<sup>-1</sup>

Fig. 4. High performance industrial scale ion exchange chromatography (work from Pharmacia Fine Chemicals)

drolase I 를 L27 strain에서 molecular cloning을 하고 culture medium에 유리된 cellulase를 DEAE-Sepharose CL-6B와 SP-Sephadex C- 50 chromatography를 이용하여 83%의 회수율을 보였다.

최근에 Pharmacia Fine Chemicals에 개발되어 공업적 규모로 사용되는 Sephamic Gel Filter GF 08-015라는 ion exchanger는 Fig. 4에 표시된 바와 같이 regeneration time 까지 포함하여 cycle time이 60분밖에 안걸리며 1시간에 75 liter의 혈장을 처리할 수 있는 능력을 갖추어 공업적으로 응용이 기대되고 있다.

#### 4 - 3 - 2. Affinity chromatography에 의한 정제방법

Biospecific adsorption을 이용한 방법이거나 Affinity chromatography에 의한 정제방법은 현재 알려진 분리 및 정제방법 중에서 가장 유용하고 그 이용도에 있어서 가장 큰 잠재력을 갖고 있는 방법으로 평가되고 있다. 특히 고순도와 specificity를 요하는 의약품인 vaccine, 혈몬등의 정제기술로서 현재 많이 사용되고 있는데 정제물질과의 adsorption은 batch reactor나 column system 어느 것도 가능하며 특히 점도가 높은 용액 중이나 미립자를 많이 포함한 추출용액 중에서 목적물을 분리 및 정제할 때 특히 유용한 방법이다. Fig. 5에서와 같이 immobilized heparin을 이용하여 plasma (2500 liter)에서 antithrombin III를 정제하거나 Table 3와 같이 monoclonal antibody column을 이용

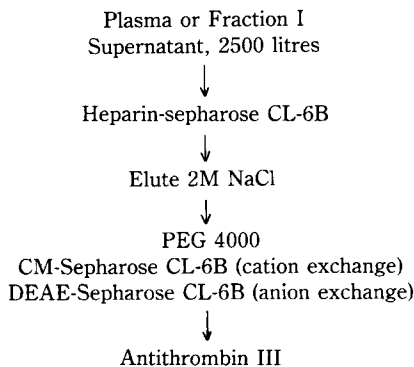


Fig. 5. Preparation of antithrombin III from plasma.

Table 3. Purification of Alpha inteferon from *E. coli* extracts on a monoclonal antibody column(24).

| Step                              | Total Protein (mg) | Purification factor | Recovery |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|----------|
| Ammonium sulphate fraction        | 37,100.            | 1.0                 | 100%     |
| Antibody column (Affi-Gel 10-LIS) | 30.                | 1,150.              | 95%      |
| CM 52                             | 20.                | 1,500.              | 81%      |

하여 *E. coli*에서  $\alpha$ -interferon의 정제시 회수율이 90~95%의 높은 수득율과 고순도의 product를 얻을 수 있었던 것과 같이 affinity chromatography에 의한 정제방법이 단 정제기술에 비해 탁월함을 보여주는 것이다. 따라서 이들 affinity chromatography를 이용하여 공업적 규모에서 제품정제를 위해 경제성과 효율성을 높이기 위해 계속 개발해야될 분야로 관심을 가져야 되겠다.

#### 5. Ultrafiltration을 이용한 product의 농축 및 정제방법

이 방법은 요즘 제약계나 biochemical industry에서 공업적 규모로 널리 이용되고 있는데 효소, 혈몬 및 혈액성분의 정제와 농축에 이용되고 있으며 특히 bacterial cell wall에서 유래된 pyrogen(일반적으로 lipopolysaccharide)은 autoclaving이나 microporous membrane filtration에 의해 제거가 안되는데 ultrafiltration으로 효과적이고 또 경제적으로 이 pyrogen을 제거할 수 있어(polysulfone membrane, M. W. cut off: 10,000 dalton, 을 일반적으로 사용) 많이 이용되고 있는 정제방법이다(Table 4)

Ultrafiltration에 의한 분리는 기본적으로 분자의 크기에 의하나 분자의 전하 및 형태도 영향을 끼치는데 콜로이드 입자를 포함하여 분자량이 1,000~1,000,000 MW 범위의 물질은 막에 걸리지며 물이나 염분등은 통과할 수 있다. 막은 구멍의 크기별로 제조되어서 분리될 목적물의 크기에 따라 용도별로 선택할 수 있다. 최근

**Table 4.** The Application of Ultrafiltration Method.

| Application              | Flow Channel |        | Membrane Area<br>Per Cartridge | Molecular Weight<br>Cut Off | P <sub>in</sub>    | P <sub>out</sub> |
|--------------------------|--------------|--------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|
|                          | Width        | Length |                                |                             |                    |                  |
|                          | mm           | m      | m <sup>3</sup>                 |                             | Kg/Cm <sup>2</sup> |                  |
| Biopolymer Concentration | 1.25         | 0.317  | 0.75                           | 50,000                      | 2.72               | 0.34             |
| Cell Harvesting          | 1.1          | 0.635  | 1.50                           | 100,000                     | 1.70               | 0.34             |
| Pyrogen Removal (Water)  | 0.5          | 1.092  | 5.0                            | 10,000                      | 1.70               | 1.36             |
| Peptide Concentration    | 1.1          | 1.092  | 2.5                            | 1,000                       | 2.0                | 1.36             |
| Plasma Processing        | 1.1          | 0.635  | 1.50                           | 10,000                      | 2.72               | 0.34             |

\*Velocity proportional to P<sub>in</sub> - P<sub>out</sub>

Average Transmembrane Pressure equal to  $\frac{P_{in} + P_{out}}{2}$

에는 tangential flow 방식에 의해 효율적으로 여과하도록 고안되어 있다. 膜의 材質은 여러 종류가 있으나 Millipore의 경우 polysulfone, cellulose acetate 등으로 구성되어 있다.

## 6. rDNA 기술을 응용한 product의 정제기술

Villa-Komaroff (1978) 등이 proinsulin sequence를 23 아미노산 signal sequence를 함유한

*E. coli*의 penicillinase 유전자에 fusion 시키므로 product인 insulin을 활성형으로 periplasmic space로 secretion시킬 수 있었다는 보고가 있은후 Talmadge (1980) 등은 bacterial의 penicillinase 유전자 또는 eucaryote의 insulin 유전자의 signal sequence를 fusion시킨후 발현된 insulin이 periplasmic space로 transport된 것을 밝혀냈다 (Table 5).

최근에는 Rothstein (1984)은 yeast expression vector에 signal sequence를 structural

**Table 5.** Amino sequence of hybrid signal sequences and summary of transport data.

|               |                                      |               |                 |                       |                    |      |
|---------------|--------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------------|--------------------|------|
| Pen*          | MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA              | ↓HPETLVK..... |                 |                       |                    |      |
| 127/+4        | MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA              | HPET          | <i>AAGGGGGG</i> |                       | QHLC...            | >90% |
| 125/-21       | MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA              | HP            | <i>LQGGGGG</i>  | WMRFLPLLALLVLWEPKPAQA | FVKQHLC...         | >90% |
| 112/-21       | MSIQHFRVALIP                         |               | <i>LQGGGGG</i>  | WMRFLPLLALLVLWEPKPAQA | FVKQHLC...         | >90% |
| 14/-21        | MSIQ                                 |               | <i>AAAG</i>     | WMRFLPLLALLVLWEPKPAQA | FVKQHLC...         | >90% |
| 125/-7        | MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA              | HP            | <i>LQR</i>      |                       | EPKPAQA FVKQHLC... | 50%  |
| 124/-7        | MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA              | H             | <i>RCS</i>      |                       | EPKPAQA FVKQHLC... | 50%  |
| 112/-7        | MSIQHFRVALIP                         |               | <i>LQR</i>      |                       | EPKPAQA FVKQHLC... | <10% |
| 19/-7         | MSIQHFRVA                            |               | <i>RCS</i>      |                       | EPKPAQA FVKQHLC... | <10% |
| 14/+4         | MSIQ                                 |               | <i>AAGGGGGG</i> |                       | QHLC...            | <10% |
| Preproinsulin | MALWMRFLPLLALLVLWEPKPAQA ↓FVKQHLC... |               |                 |                       |                    |      |

Each sequence begins at the penicillinase Met and ends at amino acid 7 of proinsulin. Each line represents one continuous sequence which has been grouped to emphasize similarities and differences as follows: first group, penicillinase signal sequence amino acids; second group, matured penicillinase amino acids; third group, amino acids created by the inserted *Pst* linker (italics) or by poly (G,C) tailing (glycines); fourth group, preproinsulin signal sequence amino acids; fifth group, matured proinsulin amino acids through amino acid 7. The arrows above the prepenicillinase and preproinsulin sequences indicate sites of cleavage for maturation. The sequence for prepenicillinase is from refs. 9 and 10; the sequence for preproinsulin is from refs. 7 and 22. A, Ala; R, Arg; C, Cys; Q, Gln; E, Glu; G, Gly; H, His; I, Ile; L, Leuk; K, Lys; M, Met; F, Phe; P, Pro; S, Ser; T, Thr; W, Trp; V, Val.

\*Penicillinase

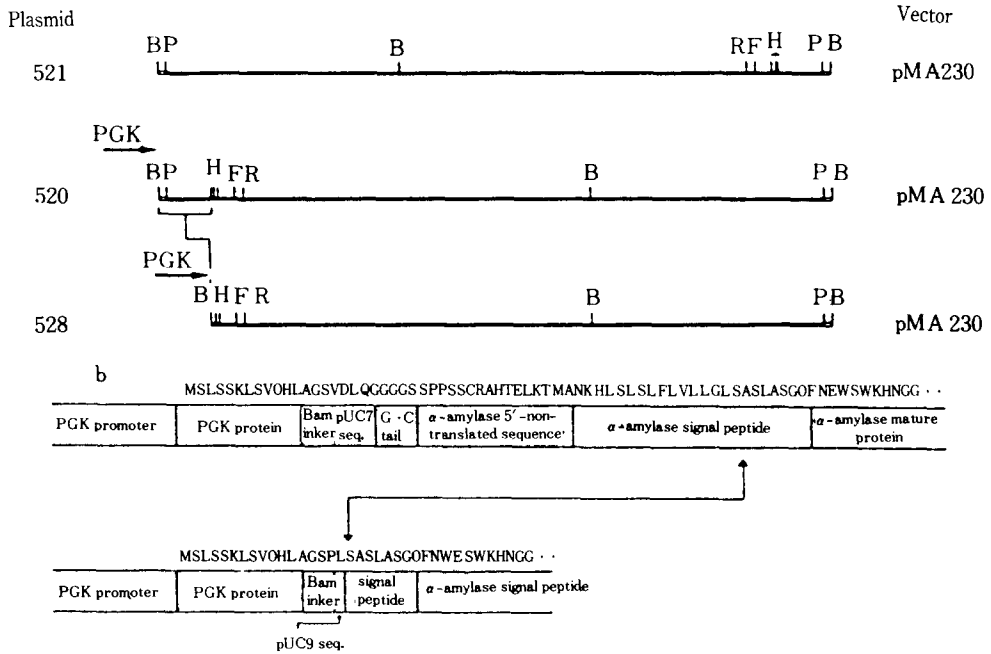


Fig. 6. Plasmids Constructed to Analyze  $\alpha$ -Amylase Synthesis in Yeast.

gene 중간에 갖고 있는  $\alpha$ -amylase 유전자를 fusion 시킨 후 (Fig. 6), yeast에서 발현시켜본 결과  $\alpha$ -amylase가 활성형으로 배양액 중에 유출되어 있음을 밝혀냈다.

이와 같이 yeast에서 발현된 효소가 plant signal sequence에 의존하여 배양액 중에 유리된 예로 봐서 signal sequence를 fusion시키므로 intracellular protein을 periplasmic space 또는 medium으로 유리시킬 수 있다면 primary recovery 과정에서 product의 recovery가 쉽고 정제도 비교적 단순하게 될 수 있기 때문에 요즘 生成物을 periplasmic space 또는 배양액으로 유리시킬 수 있는 기술을 개발하기 위해 많은 연구가 진행되고 있으며 일부 실용단계에 들어가 있는 것을 볼 수 있다. 또 하나의 흥미있는 정제방법으로 Searle의 R & D group (High Wycombe, Uk)에서 개발한 방법을 소개하면 다음과 같다.

즉 rDNA 기술을 이용하여 human urogastron의 c-terminal에 polyarginine으로 fusion시켜 세포 내에서 발현시킨 후 fusion된 polyarginine의 ba-

city를 이용하여 cell homogenate로부터 단지 두 단계의 SP-Sephadex C-25의 ion exchange chromatography를 이용 95%의 고순도와 44%의 수득율을 보여준 바 있는데 이와 같은 정제방법은 간단하고 효율적이며 매우 경제적인 뿐만 아니라 쉽게 scale-up하여 공업적 규모에서 고순도의 생성물을 얻을 수 있어 그 응용도가 매우 높다고 하겠다.

## 7. 結 論

rDNA 기술을 이용하여 과거에는 불가능했던 인류에게 유용한 생리활성 물질의 대량생산이 현실적으로 가능한 시점에 놓여 있다. 그러나 rDNA 기술을 이용하여 医薬品 開發을 하기 위해 upstream (유전자조작) 기술의 完成後 downstream processing 단계를 거쳐 医薬品으로 연결되기까지는 실제로 많은 중간 단계를 거쳐야 되고 특히 제품의 産業化를 위해서 각 단계마다 해결해야될 기술적인 "Know-how"의 축적 및 개발이 절실히 요구되는 실정에 있다.



Downstream processing 기술의 개발은 흔히들 upstream 기술이 完成된 후에 시작해야 한다는 통념을 갖고 있으나 극심한 국제 경쟁시대에 살고 있는 우리로서, 특히 외국에서는 遺伝工學製品이 市場化되고 있는 시점에서 한시바삐 우리나라도 이 두 가지 기술개발에 같은 비중으로 연구 개발토록 노력을 경주해야 할 것이다.

### REFERENCES

1. *Biotech 84, Europe* (1984), The World biotech report Vol. 1 pp. 305-343.
2. Hedman, p, (1983), Presented at "Standardization and control of biologicals produced by r. DNA technology" Geneva, Switzerland, Nov. 29-Dec. 1.
3. Kleid, P.G., *et al.* (1981) *Science* **214**, 1125-1129.
4. Cabezon, T. *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 6594-6598.
5. Frej, A-K, Gustaffson, J-G, and Hedman, p. (1984). *Third European Congress on Biotechnology, Vol. 1.* I-655-663.
6. Hoare, M., and Dunnill, p. (1984). *as above, Vol. 1.* I-591-596.
7. Shoemaker, S. *et al.* (1983), *Biotechnology, Vol. 1.* No. 8. 687-690.
8. McAleer, W.J. *et al.* (1984), *Nature*, **307**, 5947, 178-180.
9. Villa-Komaroff, L., *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **75**, 3727-3731.
10. Talmadge, K. *et al.* (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **77**, 6, 3369-3373.
11. Rothstein, S.J., *et al.* (1984), *Nature* **308**, 662-667.