

대장균에서 재조합메타게놈리파제 유전자의 젓당유도발현특성

박성옥, 여충일

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학연구사업을 더욱 강화하여 세포공학과 유전자공학, 초고압물리학, 극저온물리학을 발전시키며 레이자와 플라즈마기술, 원자에너지와 태양에너지를 개발하여 인민경제에 받아들이는 데서 나서는 과학기술적문제를 적극 풀어나가야 하겠습니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 139페이지)

리파제(EC 3.1.1.3)는 향료 및 식료가공공업, 세척제공업에서 그리고 생물디젤유와 여러가지 유기화합물의 생산에서 가장 많이 리용되고있는 효소들중의 하나이다.[1, 2, 4]

우리는 해양퇴적물로부터 제조한 메타게놈서고기원의 리파제유전자[3]를 대장균에서 발현시키기 위한 발현체계를 확립하고 유도발현조건을 검토함으로써 유전자공학적방법으로 메타게놈리파제의 대량생산을 실현하기 위한 기초연구를 하였다.

재료와 방법

균그루로는 우리가 이미 만든 재조합대장균 *E. coli* BL21(pET28a-lipE)을 리용하였다.

하루밤동안 배양한 재조합균그루를 LB배지(Kan⁺ 50μg/mL)에 1% 되게 접종하고 37℃, 200r/min에서 4h동안 초기배양을 진행한 다음(OD₆₀₀ 측정) 젓당을 첨가(10mmol/L)하고 30℃, 200r/min에서 10h동안 배양하는 방법으로 유도배양을 진행하였다. 배양액을 원심분리(4℃, 4 000r/min, 30min)하여 균집(배양액 50mL에 해당 균그루의 균체량 약 0.7g)하고 0.9% NaCl 용액으로 두번 세척한 다음 용균완충용액(20mmol/L Tris-HCl+50mmol/L NaCl+1mmol/L EDTA, pH 8.0)을 50mL 첨가하여 초음파처리를 진행(250W, 30%에서 8s씩 15회)한 후 원심분리(10 000r/min, 10min)하여 상청액(세포질가용성분획)을 얻었다.[4]

pNP-C4(*p*-니트로페닐버터산)를 기질로 하여 선행방법[3]으로 상청액의 리파제활성을 측정하였다. 리파제활성 1U는 1min동안에 1μmol의 *p*-니트로페놀을 생성하는 효소량으로 정의하였다.

결과 및 논의

E. coli BL21(pET28a-lipE)을 대상으로 하여 배양액의 리파제활성에 미치는 몇가지 배양조건의 영향을 보았다.

1) 초기배양시간의 영향

먼저 재조합리파제유전자발현에 미치는 초기배양시간의 영향을 조사하였다. 초기배양을 37℃에서 2~6h동안 진행한 다음 유도제로 젓당을 10mmol/L 되게 첨가하고 유도배양을 30℃에서 10h 진행하였을 때 세포질가용성분획의 리파제활성을 측정하였다. 초기배양시간에 따르는 리파제활성은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 대수적증식기에 있는 초기배양(2~4h)에서는 균체량증가에 따라 활성도 높아졌으며 특히 균체농도도 높고 균이 왕성한 생장기에 있을 때(초기배양 4h에 해당) 유도제를 넣은 시료에서 활성이 가장 높았다. 반대로 균이 대수적증식기 말기로부터 정상기에 들어선 다음(초기배양 5~6h에 해당) 유도배양을 시작한 시료들에서는 점차 활성이 낮아졌는데 이것은 균이 로화되는 것과 관련된다고 볼 수 있다. 목적단백질의 생산량은 균체량과 목적단백질의 발현수준에도 관계되므로 목적단백질의 생산량을 높이기 위하여서는 균체량을 증가시키는 것과 동시에 목적단백질의 발현량도 증가시켜야 한다. 목적단백질의 발현량을 증가시키기 위하여서는 유도시기와 유도제 농도를 바로 정하는 것이 매우 중요하다.

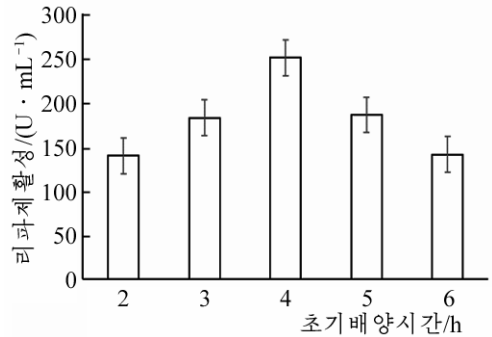


그림 1. 초기배양시간에 따른 리파제 활성

증식배양때 대수적증식기 초기의 낮은 균체농도에서 목적유전자발현을 위한 유도배양을 진행하면 비록 목적단백질의 발현수준은 높아도 균체생산량이 적어지므로 최종적인 목적단백질생산량은 적어진다. 또한 증식배양 대수적증식기 말기의 높은 균체농도에서 목적유전자발현을 위한 유도배양을 진행하면 배양이 오래동안 진행되는 과정에 배지속에 초산을 비롯한 유기산들과 같은 대사산물들이 축적되므로 균이 로화되어 목적단백질생합성능력이 떨어져 균체생산량은 많지만 전반적인 발현수준이 높지 못하여 최종적인 목적단백질생산량은 적어진다.

목적단백질과 발현형식, 대장균숙주에 따라 유도시기는 차이나지만 초기배양시간을 4h(이때의 OD₆₀₀는 2.1~2.3, 대수적증식기에 해당)로 하고 유도제를 첨가하여 유도배양을 진행하는 것이 재조합리파제유전자의 발현에 적합하였다.

2) 유도제농도의 영향

재조합리파제의 발현에 미치는 젓당농도의 영향을 검토하기 위하여 37°C에서 4h동안 초기배양을 진행한 다음 젓당을 각이한 농도(2~12mmol/L)로 첨가하고 30°C에서 10h동안 유도배양을 진행한 다음 세포질가용성분획의 리파제활성을 측정하였다. 유도제농도에 따르는 리파제활성은 그림 2와 같다.

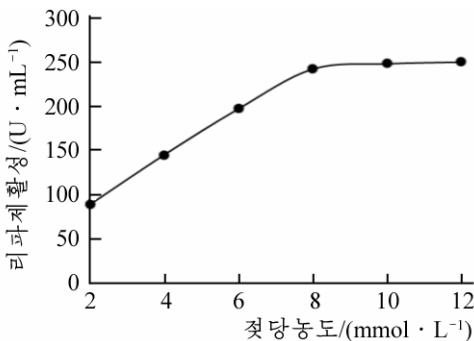


그림 2. 유도제농도에 따른 리파제 활성

그림 2에서 보는바와 같이 젓당농도가 증가함에 따라 리파제활성이 증가하였으며 8mmol/L 이상의 농도에서부터는 포화되었다.

배지속에 유도제인 젓당의 농도가 높을수록 리파제유전자의 유도발현이 진행되는 것과 함께 대장균내에서 젓당오페론의 유도발현산물인 β -갈락토시다제의 활성이 높아지고 이에 의해 젓당이 분해된다. 즉 젓당농도가 높다고 하여 유도발현이 잘 진행되는 것은 아니며 그림 2에서 보는바와 같이 젓당농도 8mmol/L 근방에서 리파제의 활성이 포화에 도달하였으므로 리파제유전자의 유도발현에 적합한 젓당의 농도를 8mmol/L로 정하고 실험을 진행하였다.

3) 유도배양온도와 유도배양시간의 영향

재조합리파제의 발현에 미치는 유도배양온도 및 유도배양시간의 영향을 검토하였다. 37°C에서 4h동안 초기배양을 진행한 다음 유도제로 8mmol/L 되게 젖당을 넣고 25, 30, 37°C에서 각각 유도배양을 진행하면서 배양시간에 따르는 세포질가용성분획의 리파제활성을 측정하였다. 유도배양시간에 따르는 리파제활성은 그림 3과 같다.

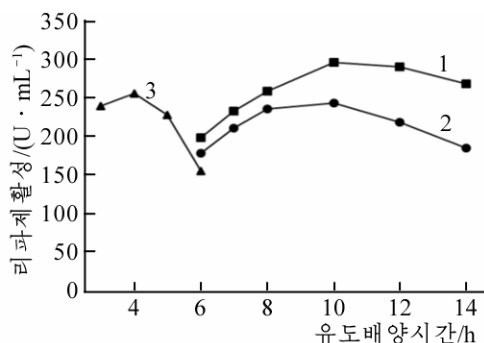


그림 3. 유도배양시간에 따르는 리파제활성
1-3은 유도배양온도가 각각 25, 30, 37°C인 경우

그림 3에서 보는바와 같이 25°C에서 10h동안 배양했을 때 리파제활성이 가장 높았다. 유도배양온도는 세균의 성장과 세포대사를 조절하는 중요한 인자이다. 비교적 높은 온도는 균생장을 촉진하고 균체량이 많아지게 하지만 재조합단백질의 유도발현에서는 유도배양온도가 낮을수록 발현에 유리한 경우가 많다.

높은 온도는 재조합대장균의 성장을 촉진하고 물질대사속도를 높여 목적단백질생합성속도를 높이지만 목적단백질이 분비형이 아닌 경우 단백질밀도가 높아져 봉입체가 형성될수 있다.

37°C에서 4h 배양하였을 때와 25°C에서 10h 배양하였을 때 효소활성에서 큰 차이는 없었다. 생산성을 높이는 측면에서는 높은 온도에서 짧은 시간 배양하는것이 더 유리하다. 그러나 37°C에서의 배양에서는 배양시간이 길어짐에 따라 효소활성이 급격히 떨어졌으며 25°C에서의 배양에서는 최적배양시간을 초과하였을 때 효소활성의 저하정도가 보다 완만하였다. 이로부터 25°C에서 10h 배양하는것이 더 합리적이라고 보았다.

이상의 실험결과를 통하여 재조합리파제유도발현조건을 초기배양(37°C, 200r/min) 4h, 유도제(8mmol/L의 젖당) 첨가, 유도배양(25°C, 200r/min) 10h로 정할수 있다. 즉 하루밤동안 해당 항생소를 포함한 LB배지에서 배양(37°C, 200r/min)한 종균을 같은 LB배지에 1% 되게 접종하고 37°C, 200r/min에서 4h동안 초기배양을 진행한 다음 유도제로 젖당을 8mmol/L 되게 첨가하여 25°C, 200r/min에서 유도배양을 10h 진행하였을 때 세포질가용성분획의 효소활성은 *p*-니트로페버터산을 기질로 하여 측정하였을 때 300U/mL였다.

맺 는 말

대장균에서 메타게놈리파제유전자를 발현시키는데 합리적인 초기배양조건은 37°C, 200r/min에서 4h(OD₆₀₀=2.1~2.3)이며 젖당농도는 8mmol/L, 유도조건은 25°C, 200r/min에서 10h이다.

참 고 문 헌

- [1] M. B. Grazia et al.; Int. J. Mol. Sci., 16, 20774, 2015.
- [2] Wen Yuan Gao et al.; Microbial Cell Factories, 15, 41, 2016.
- [3] Qing Peng et al.; Microbial Cell Factories, 13, 1, 1, 2014.
- [4] Rashmi Sarasmat et al.; Electronic Journal of Biotechnology, 30, 33, 2017.

Lactose-Induced Expression Characteristics of Recombinant Metagenomic Lipase Gene in *Escherichia coli*

Pak Song Ok, Yo Chung Il

When *E. coli* BL21(pET28a-lipE) is cultivated at the condition of 4h($OD_{600}=2.1\sim2.3$) of early culture time, 10h of induction culture time, 25°C of induction temperature, and at 8mmol/L of lactose, the cytoplasmic lipase activity in *Escherichia coli* BL21(pET28a-lipE) is about 300U/mL.

Keywords: lipase, metagenome