

먹이첨가제용재조합피타제의 제제조건

허 영 원

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《우리는 자체의 원료에 의거한 먹이첨가제생산방법을 연구완성하여 축산기지운영에 필요한 먹이첨가제를 생산보장하도록 하여야 합니다.》

피타제(EC 3.1.3.26)는 식물성먹이속에 많이 들어있는 피틴(이노시톨-1, 2, 3, 4, 5, 6-헥사린산)을 물작용분해하여 동물이 리용할수 있는 린산과 이노시톨로 전환시키는 효소로서 린과 여러가지 광물질영양을 개선하고 과잉의 린방출에 의한 환경오염을 막는것으로 하여 단실위동물들의 먹이첨가제로 광범히 리용되고있다.[3]

우리는 재조합대장균피타제발현대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)의 고밀도세포 배양산물로부터 먹이첨가제용재조합피타제를 제제화하고 그 보관안정성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료로는 자동배양탱크(《Biotech》, 30L)에서 재조합대장균피타제발현대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)의 고밀도세포배양물을 리용하였다.

균체의 수집과 처리 및 제제화 배양액을 원심분리하여 균체를 모으고 0.85% NaCl용액으로 두번 세척한 다음 용균완충액(20mmol/L 트리스-HCl, pH 8.0, 50mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA)을 일정한 량 넣고 얼음욕에서 초음파마쇄기(500W, 20kHz)를 리용하여 초음파처리하였다.

초음파처리액의 원심분리상청액과 150 μ m 체를 통과시킨 강냉이농마와 밀가루, 강냉이가루, 벼겨가루를 해당한 비율로 혼합하고 각이한 온도조건(통풍건조기 《OHG-9053BS》, 20~60 $^{\circ}$ C)에서 건조시켰다. 제제품의 물기함량은 105 $^{\circ}$ C에서 항량건조시키는 방법으로 측정하였다.

제제품의 보관안정성은 4 $^{\circ}$ C와 25 $^{\circ}$ C(방온도) 조건에서 12개월 보관하고 3달에 한번씩 활성을 측정하여 상대활성으로 평가하였다.

피타제활성측정 분석천평으로 피타제제품 1.000g을 취하여 일정한 량의 0.2mol/L 초산완충액(pH 4.5)에 넣고 시험관진탕기(《Velp》)에서 30min동안 추출하여 같은 완충액으로 적당히 희석한 다음 선행방법[5]을 변경시켜 측정하였다.

피타제효소활성 1U는 37 $^{\circ}$ C, pH 4.5조건에서 6.25mmol/L 피틴산나트륨용액으로부터 1min동안에 1 μ mol의 무기린을 생성하는 효소량으로 정의하였다.

결과 및 논의

효소추출물에 주는 초음파처리조건의 영향 고밀도세포배양을 통하여 얻은 것은 균체 100g에 용균완충액을 각각 200, 300mL씩 첨가하고 초음파마쇄기에서 3min 동작, 10min 정지를 반복하면서 초음파마쇄처리하였을 때 처리시간에 따르는 OD₆₀₀값과 효소추출물의 변화를 보면 그림 1과 같다.

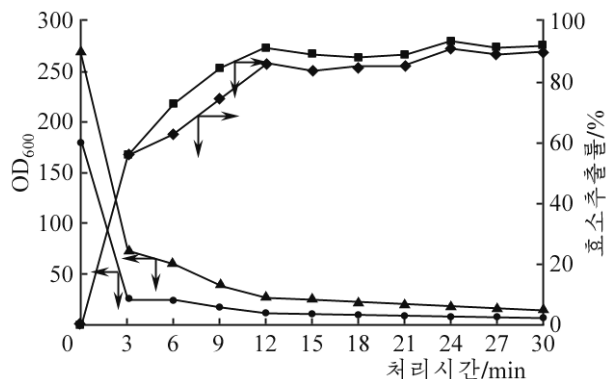


그림 1. 초음파마쇄처리시간에 따르는

OD₆₀₀값과 효소추출물의 변화

OD₆₀₀값은 희석하여 측정하였음; ● 균체-용균완충액(1:3)에서 흡광도값, ■ 균체-용균완충액(1:3)에서 효소추출물, ▲ 균체-용균완충액(1:2)에서 흡광도값, ◆ 균체-용균완충액(1:2)에서 효소추출물

그림 1에서 보는바와 같이 균체 : 용균완충액비(w/v)를 1 : 2, 1 : 3으로 하였을 때 다같이 초음파마쇄처리시간이 길어질수록 흡광도값이 급격히 떨어지면서 동시에 효소추출물이 높아졌다. 그러나 처리시간 12min 이상에서는 그 효과가 뚜렷하지 않았다. 이것은 500W 초음파마쇄기로 재조합대장균을 마쇄처리할 때 고액비를 1 : 2로, 처리시간은 12min으로 하는것이 합리적이라는것을 보여준다.

부형제종류의 영향 밀가루와 강냉이농마, 강냉이가루, 벼겨가루를 효소추출액과 1 : 1로 혼합하여 40℃에서 건조시킬 때 제제거뭉를 측정 한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 부형제종류에 따르는 제제거뭉

부형제 종류	고액비	제제전		제제후		거뭉물 %
		효소용액활성 /(U·mL ⁻¹)	효소용액체적 /mL	제제품활성 /(U·g ⁻¹)	제제품질량 /g	
밀가루	1 : 1	2 096	50	1 460	50	69.7
강냉이농마	1 : 1	2 096	50	1 875	50	89.5
강냉이가루	1 : 1	2 096	50	1 494	50	71.3
벼겨가루	1 : 1	2 096	50	1 775	50	84.7

표 1에서 보는바와 같이 재조합피타제제제화에 합리적인 부형제는 강냉이농마라고 볼 수 있다. 강냉이가루나 밀가루를 리용할 때에는 건조되면서 자체의 점착성으로 하여 건조효율이 떨어졌으며 건조후에는 덩어리상태로 되므로 다시 분쇄하여야 하는 부족점이 있다. 재조합피타제생산에서 부형제로서는 강냉이농마, 강냉이속가루, 강냉이껍질가루, 벼겨가루, 벼짚가루, 밀기울, 쌀겨, 굴찌끼, 사과껍질 등 농부산물들을 많이 리용하고있다.[2, 4] 거뭉물에서 일정한 차이는 있으나 벼겨가루를 부형제로 리용하는것이 보다 합리적이라고 본다.

건조온도의 영향 벼겨가루와 효소용액을 1 : 1(w/v)로 혼합하고 20, 30, 40, 50, 60℃에서 통풍건조시킬 때 건조시간과 제제거뭉를 측정 한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 건조온도에 따르는 제제거둠률

건조온도 /°C	건조시간 /h	제제전 총활성		제제후 총활성		거둠률 %
		효소용액활성 /(U·mL ⁻¹)	효소용액체적 /mL	제제품활성 /(U·g ⁻¹)	제제품질량 /g	
20	9.0	2 096	100	1 754	100	83.7
30	6.0	2 096	100	1 738	100	82.9
40	3.0	2 096	100	1 775	100	84.7
50	2.0	2 096	100	1 477	100	70.5
60	1.5	2 096	100	1 280	100	61.1

표 2에서 보는바와 같이 건조온도가 높아질수록 건조시간이 빨라지지만 거둠률은 낮아졌으며 반대로 건조온도가 낮아지면 거둠률에서는 유의성있는 차이가 없이 건조시간이 길어지는 결함이 있다. 분리정제한 재조합피타제가 40°C이하의 온도에서 비교적 안정하다는 결과[1]와 우의 실험자료로부터 우리는 합리적인 건조온도를 40°C로 정하였다.

고액비의 영향 버겨가루를 부형제로 리용하여 효소용액을 각이한 비율로 혼합하고 40°C에서 건조시킨 후 거둠률을 측정한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 부형제-효소용액비에 따르는 제제거둠률

부형제-효소용액 혼합비율	건조시간 /h	제제전		제제후		거둠률 /%
		효소용액활성 /(U·mL ⁻¹)	효소용액체적 /mL	제제품활성 /(U·g ⁻¹)	제제품질량 /g	
1 : 1.0	3.0	2 096	100	1 775	100	84.7
1 : 1.5	5.5	2 096	150	2 354	100	74.9
1 : 2.0	8.0	2 096	200	2 858	100	68.2
1 : 3.0	10.0	2 096	300	3 798	100	60.4

표 3에서 보는것처럼 부형제-효소용액비가 증가함에 따라 제제품의 건조시간이 길어지면서 거둠률이 낮아졌는데 이것은 건조시간이 길어짐에 따라 효소가 불활성화되기때문이라고 볼수 있다. 한편 부형제-효소용액비를 1 : 0.75, 1 : 0.5로 낮출 때 건조시간이 짧아지고 거둠률이 높아지지만(결과는 보여주지 않음) 제제품활성은 낮아지므로 합리적인 부형제-효소용액비를 1 : 1로 정하였다.

재조합피타제의 보관안정성 제조한 재조합피타제의 보관안정성을 검토한데 의하면(그림 2) 4°C와 25°C에 보관할 때 1년까지 다같이 활성이 90%이상으로 유지되었다. 그러나 물기함량이 14%인 제제품을 25°C에서 보관할 때 9개월 지나 활성은 90%이하로 떨어졌다.(결과는 보여주지 않음) 이것은 재조합피타제가 매우 안정한 제품이며 제품의 물기함량을 12%이하로 보장하는 것이 합리적이라는것을 보여준다.

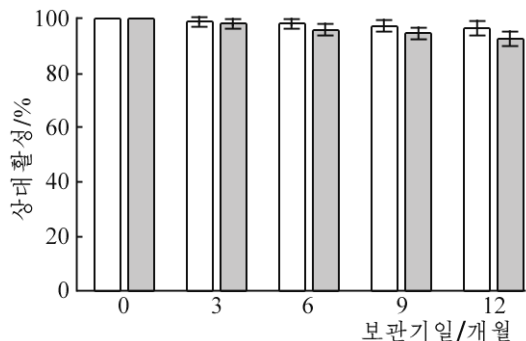


그림 2. 재조합피타제의 보관안정성
□ 4°C 보관, ■ 25°C 보관, 제제품초기활성 1 043U/g, 물기함량 12%, 초기활성에 대한 비율(%)로 표시함

맺는말

1) 재조합피타제의 합리적인 제제조건은 초음파처리시간 12min, 부형제를 벼겨가루로 하여 효소용액과 1 : 1로 섞어 40℃에서 건조시키는것이다.

2) 물기함량 12%인 제제품은 방온도(25℃)조건에서 12개월 보관할 때 90%이상의 활성을 유지한다.

참고문헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 6, 110, 주체105(2016).
- [2] G. E. A. Awad et al.; Saudi Journal of Biological Sciences, 6, 4, 1, 2013.
- [3] X. G. Lei et al.; Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 283, 2013.
- [4] M. R. Spier et al.; Food Technol. Biotechnol., 46, 2, 178, 2008.
- [5] G. Miksch et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 685, 2002.

주체105(2016)년 4월 5일 원고접수

Preparation Conditions of the Food-Additive, Recombinant Phytase

Ho Yong Won

The reasonable preparation conditions of the recombinant phytase are as follows: ultrasonic wave treating time 12min, mixing ratio with phytase solution 1:1(w/v) by using rice bran as vehicle and drying temperature 40℃.

The recombinant phytase with 12% moisture content is stable for 12 months at the room temperature(25℃) condition.

Key words: *Escherichia coli*, phytase, preparation condition