

## 피라제발현재조합대장균(*Escherichia coli* BL21 (pET-appA))의 몇가지 첨가주기배양특성연구

허영원, 김주성, 리형관

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과학연구부문에서는 과학기술로 경제발전의 길을 열고 과학기술로 경제를 이끌어 나가야 한다는 관점과 입장을 가지고 우리 경제의 자립성과 주체성을 강화하며 인민생활을 향상시키기 위한 과학기술적방안과 실행대책을 명확히 세우고 집행해나가야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 40페이지)

우리는 축산업분야에서 중요한 의의를 가지는 먹이첨가제용린가용화효소 피라제를 대량발현시키는 재조합대장균피라제발현대장균주 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)을 육종[1]하고 합리적인 합성배지를 확정[2]한데 기초하여 재조합대장균의 고밀도세포배양을 위한 첨가배지, 첨가방법을 비롯한 몇가지 첨가주기배양특성을 연구하였다.

### 재료 및 방법

재료 재조합균주로는 *E. coli* BL21(pET-appA)을 리용하였다.

배지조성은 다음과 같다.

LB배지 펩톤 1%(w/v), 효모엑스 0.5%(w/v), NaCl 0.5%(w/v), pH 7.0.

합성배지조성[2] 1L당 포도당 5.0g, 15%  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$  10.0mL,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  17.0g, NaCl 2.0g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, 미량원소용액 3.2mL, pH 7.0.

미량원소용액조성 1L당  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.784mg,  $\text{MnCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  3.303mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.032mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.064mg,  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.512mg,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  8.008mg,  $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.134mg,  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.032mg.

첨가배지조성 1L당 포도당 500g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20g.

미량원소용액과 배양과정에 리용한 암모니아수는 려과멸균하였으며 기타 배양액들은 121℃에서 20min간 고압멸균하였다.

배양방법 글리세린동결보존한 균(100μL)을 LB배지(Kan 50μg/mL) 5mL를 넣은 시험관에 접종하고 37℃에서 200r/min의 진탕속도로 4~6h동안 배양한 다음 LB배지(Kan 50μg/mL)에 1%(v/v) 접종하여 종균배양(37℃, 200r/min, 4~6h)을 진행하였다.

종균배양액을 50mL의 합성배양액을 넣은 500mL 플라스크에 1%로 접종하고 2차까지의 첨가배양을 진행하여 효과성을 확인하였다.

자동배양탱크(《BioTech-30JS》, 30L)에 16L의 합성배양액(Kan 50μg/mL)을 넣고 종균배양액을 1%(v/v) 접종한 다음 온도는 37℃, DO는 공기류량과 교반속도를 조절(200~800r/min)하여 25%로 보장해주면서 배양하였다. 배양액의 pH는 15% 암모니아수로 6.8~7.2로 유지

하였으며 배양과정에 포도당농도는 피크린산법으로 정량하였다. 균체량은 OD<sub>600</sub>, 젖은세포 질량( $W_{WC}$ )과 마른세포질량( $W_{DC}$ )을 측정하여 평가하였다.

기질첨가방법 초기배양은 pH일정법과 DO일정법[5]으로 첨가배양액을 넣어주면서 진행하였다.

플라스미드안정성은 카나미핀(Kan 50 $\mu$ g/mL)을 넣은 LB고체배지와 카나미핀을 넣지 않은 LB고체배지를 가지고 평가하였다.

배양시료를 10<sup>6</sup>배 희석하여 카나미핀을 넣지 않은 LB고체배지에 도말하고 30℃에서 12~18h동안 배양한 후 100개의 단독균무지를 취하여 카나미핀이 포함된 평판에 옮기고 30℃에서 12~18h동안 배양하여 나타난 단독균무지를 계수하였다. 플라스미드안정성(%)은 다음의 식에 의해 평가하였다.

$$\text{플라스미드안정성} = \frac{\text{Kan}^+ \text{평판균무지수}}{\text{Kan}^- \text{평판균무지수}} \times 100$$

유도배양단계에서 첨가배양액은 지수첨가방법으로 설정한 비증식속도에 맞게 다음의 첨가방정식을 리용하여 첨가하였다.

$$F(t) = \frac{e^{\mu t} \mu X_0 V_0}{Y_{X/S} S_F}$$

여기서  $F(t)$ 는 첨가속도(L/h),  $\mu$ 는 비증식속도(h<sup>-1</sup>),  $S_F$ 는 첨가용액의 기질농도(g/L),  $t$ 는 시간(h),  $V_0$ 은 초기배양체적(L),  $X_0$ 은 초기균체농도(g/L),  $Y_{X/S}$ 는 균체거둠률결수이다.

피타제활성측정방법 변경한 몰리브덴청법[1]으로 측정하였다.

피타제효소활성 1U는 해당 조건에서 1min동안에 1 $\mu$ mol의 무기린을 생성하는 효소의 량으로 정의하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 진탕조건에서 첨가주기배양특성

진탕배양조건에서 균증식특성 LB배양액과 합성배양액을 넣은 플라스크에 재조합대장균 종균배양액을 1%로 접종하고 37℃, 200r/min에서 10h동안 배양했을 때 균증식특성은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 LB배지와 합성배지에서 최대OD<sub>600</sub>값은 각각 4.7, 4.3으로서 큰 차이가 없었으며 합성배지에서 최대균체량도달시간이 LB배지에 비하여 약 3h정도 늦어졌다. 이것은 LB배지에서 자란 재조합대장균이 합성배지에 적응되는 시간상차이이며 서로 다른 배지 조건에서 비증식속도(LB배지에서 0.70, 합성배지에서 0.45)의 차이에 기인된다고 본다.

또한 8mmol/L 젖당유도후 피타제활성을 측정한 결과 두 배지에서 각각 106, 101U/mL[2]였

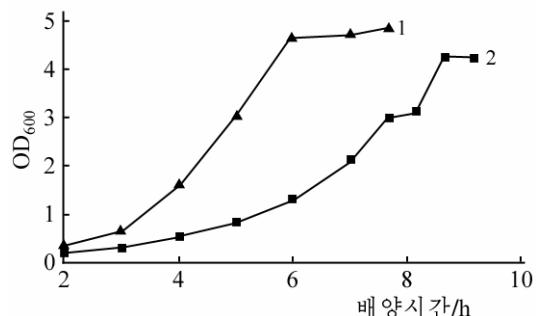


그림 1. 진탕조건에서 재조합대장균의 균증식특성  
1-LB배지, 2-합성배지

는데 이것은 합성배지가 LB배지와 유사한 균증식특성과 재조합단백질발현특성을 가지는 배지라는것을 보여준다.

진탕조건에서 첨가주기배양특성 진탕조건에서 재조합대장균의 첨가주기배양과정과 젖당

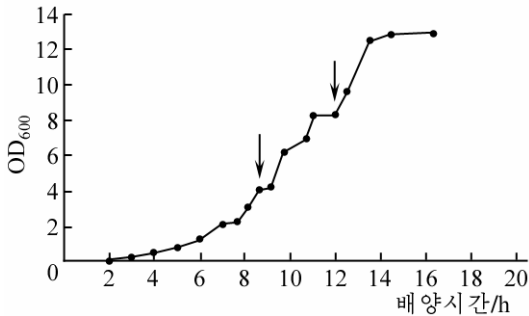


그림 2. 진탕조건에서 재조합대장균의 첨가주기배양특성  
화살표는 첨가시점을 표시함

유도후 피타제활성을 측정 한 결과는 각각 그림 2, 표 1과 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 재조합대장균의 OD<sub>600</sub>값은 1차첨가에 의해 8.3, 2차첨가에 의해 12.8까지 증가하였다. 보통 재조합대장균의 성장과 재조합단백질생산을 위한 첨가배지에는 포도당과 글리세린 등과 함께 효모엑스를 비롯한 영양성분들을 첨가한다.[7] 그러나 우리의 결과는 첨가배지에 효모엑스와 같은 영양성분들을 첨가하지 않고 포도당과 류산마그네시움만을 리용할 때에도 재조합대장균의 첨가주기배양을 실현할 수 있다는것을 보여준다.

진탕조건에서 0~2차까지의 첨가배양을 진행하고 젖당으로 유도한 후 OD<sub>600</sub>값과 피타제활성을 측정한데 의하면(표 1) OD<sub>600</sub>값에 따라 피타제활성이 선형적으로 높아졌다. 단위 OD<sub>600</sub>값 변화당  $W_{WC}$ 는 약 2.15g/L,  $W_{DC}$ 는 0.38g/L, 피타제활성은 24U/mL였다. 이로부터 우리는 포도당과 류산마그네시움만을 넣은 첨가배지에 의해서도 균체량이 증가하는것과 함께 유도발현량도 비례적으로 증가한다는것을 알수 있다.

표 1. 진탕조건에서 첨가회수에 따르는 피타제활성

첨가회수 /차	OD <sub>600</sub>	$W_{WC}$ / (g · L <sup>-1</sup> )	$W_{DC}$ / (g · L <sup>-1</sup> )	피타제활성 / (U · mL <sup>-1</sup> )
0	4.3±0.2	9.26±0.22	1.63±0.05	108±6
1	8.3±0.3	17.88±0.35	3.15±0.06	202±8
2	12.8±0.4	27.60±0.41	4.86±0.08	306±8

n=3

## 2) 자동배양탱크에서 첨가주기배양특성

첨가방법에 따르는 재조합대장균의 첨가주기배양특성 표 2에서 보는바와 같이 DO일정법에서

표 2. 첨가방법에 따르는 첨가주기배양특성

특성량	DO일정법	pH일정법
잔여포도당농도/%	0.08±0.02	0.12±0.03
15% 암모니아수소비량/mL	732±74	925±82
플라즈미드안정성/%	99±1	98±2
최종균체량( $W_{DC}$ ) / (U · mL <sup>-1</sup> )	16.5±0.8	14.2±0.8
피타제활성 / (U · mL <sup>-1</sup> )	530±28	428±26

n=3

미드안정성은 다 98%이상으로서 재조합대장균의 첨가주기배양에서 플라즈미드가 안정하게 복제된다는것을 알수 있다. 재조합대장균을 리용하여 β-카로틴과 D-아미노산옥시다제를 대량발현시키는 첨가주기배양[3, 4]에서는 우리의 실험결과와는 달리 pH일정법이 DO일정법보다 효과적인것으로 결론되었는데 이것은 탄소원으로 포도당과 함께 효모엑스나 펩

서 pH일정법에서보다 배지의 포도당이 보다 효과적으로 리용되고 15% 암모니아수 소비량이 적어졌으며 재조합피타제활성이 높아졌다. 이것은 DO일정법으로 배양할 때 기질농도변화에 맞게 첨가배양액을 넣어줌으로써 초산을 비롯한 성장저해물질량을 효과적으로 줄일수 있게 하기때문이라고 볼수 있다. 그리고 플라즈

톤과 같은 복합탄소-질소원이 포함된 복합배지를 리용하였기때문이라고 본다. 이러한 복합탄소-질소원을 리용할 때 대장균세포가 복합탄소원을 지속적으로 리용하는것으로 하여 DO값변화폭이 그리 크지 않게 되므로[5] 기질소모에 대하여 DO값이 pH값보다 예민하게 반응하지 못하게 된다. 이로부터 재조합대장균피타제발현대장균의 첨가주기배양에서는 DO 일정법으로 배양하는것이 보다 효과적이라고 본다.

유도전배양단계에서 재조합대장균의 첨가주기배양특성 배양온도를 30, 34, 37°C로 정하고 재조합대장균의 첨가주기배양을 진행할 때의 균증식특성을 조사한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 배양온도가 높아짐에 따라 재조합대장균의 증식속도가 빨라지며 이때 비증식속도는 각각 0.44, 0.41, 0.32였다. 또한 플라즈미드안정성을 검토한데 의하면 각이한 배양온도에서 다 99%이상이었다.(결과는 제시하지 않음) 일반적으로 낮은 배양온도를 리용하는 것은 배양과정에 초산을 비롯한 독성대사산물들의 양을 줄이고 세포의 산소요구성을 낮추어 통기조건이 불리한 경우에도 고밀도세포배양을 실현할수 있게 하기 위해서이다.[5] 그러나 배양시간이 길어지는 결함이 있으므로 우리는 균증식속도도 빠르고 플라즈미드안정성도 보장되는 37°C를 합리적인 배양온도로 정하였다.

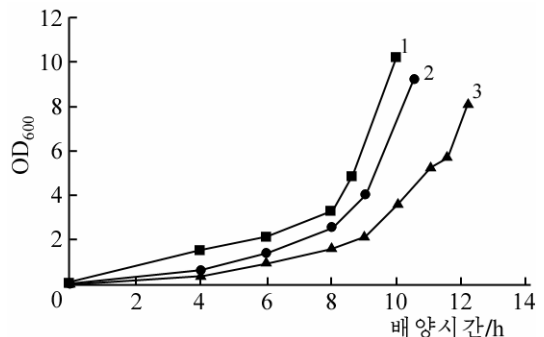


그림 3. 초기배양단계에서 재조합대장균의 첨가주기배양특성

DO 25%로 조절, 2차까지 첨가배양함  
1-37°C, 2-34°C, 3-30°C

유도배양단계에서 재조합대장균의 첨가주기배양특성 DO일정법으로 재조합대장균의 첨가주기배양을  $OD_{600}=25$ 까지 진행하고 유도제로 80mmol/L의 젓당을 첨가한 다음 25°C, 비증식속도를 0.05[1, 6]로 설정하여 배양을 진행하였다. 배양시간에 따르는 균체량증가와 피타제활성을 측정한 결과는 그림 4와 같다.

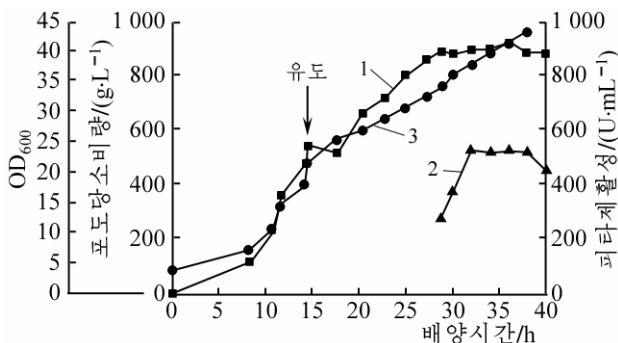


그림 4. 재조합대장균의 첨가주기배양  
1- $OD_{600}$ , 2-피타제활성, 3-포도당소비량

최적화되지 못한 결과[8]라고 본다. 초기배양과 유도배양과정에 플라즈미드안정성을 검토한데 의하면 초기배양과정에는 98%이상이었으나 유도배양과정에는 80%이하로 떨어졌다.(결과는 보여주지 않음) 그러므로 재조합대장균의 고밀도세포배양에서 균체량증가와 함께 재조합단백질 발현량도 높일수 있는 최적조건을 찾기 위한 연구가 앞으로 더 진행되어야 한다고 본다.

## 맺는 말

진탕배양조건에서 포도당과 류산마그네시움으로 이루어진 첨가배지를 2차 첨가할 때 배양 15h만에 피타제발현재조합대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)의 균체량은  $OD_{600}$  12.8( $W_{DC}$  약 4.9g/L)에 이르며 이때 피타제활성은 306U/mL에 달한다.

자동배양탱크에서 피타제발현재조합대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)을 첨가주기배양할 때 배양 36h만에 균체량은  $OD_{600}$  41( $W_{DC}$  약 16.5g/L)에 이르며 이때 피타제활성은 530U/mL에 달한다.

## 참고 문헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 4, 98, 주체104(2015).
- [2] 김일 등; 조선생물공학회지, 1, 5, 주체105(2016).
- [3] H. K. Jung et al.; Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14, 559, 2009.
- [4] J. K. Sae et al.; Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13, 144, 2008.
- [5] Y. L. Sang; Tibtech. March, 14, 98, 1996.
- [6] A. M. Sanden et al.; Biotechno. Bioeng., 81, 158, 2003.
- [7] Vibhor Saraswat et al.; Biotechnology Letters, 22, 261, 2000.
- [8] Hasan B. Coban et al.; Bioprocess Biosyst. Eng., 37, 2579, 2014.

주체105(2016)년 6월 5일 원고접수

### Some Characteristics of Fed-Batch Cultivation of the Phytase-Expressing Recombinant *E. coli* BL21(pET-appA)

Ho Yong Won, Kim Ju Song and Ri Hyong Gwan

In the shake cultivation of phytase-expressing recombinant *E. coli* BL21(pET-appA), biomass and phytase activity are  $OD_{600}$ =12.8(dry cell weight(DCW) 4.9g/L), 306U/mL respectively by using feed medium including glucose and magnesium sulphate.

In the fed-batch cultivation of phytase expression recombinant *E. coli* BL21(pET-appA), DCW is 16.5 g/L and phytase activity is 530U/mL for final  $OD_{600}$  41.

Key words: fed-batch cultivation, recombinant *Escherichia coli*, phytase