

분비형재조합대장균피타제의 분리정제와 효소학적특성

김송이, 김주성

우리는 대장균피타제유전자(*appA*)에 신호배열을 도입하여 그 분비형발현균주를 육종 [1]하고 배양 및 유도조건을 최적화하여 배지에 분비되는 피타제의 활성을 91.5U/mL까지 높인[2]데 이어 분비형재조합피타제의 효소학적특성을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

분비형재조합균주의 유도배양물을 원심분리(4 800r/min, 5min)하여 얻은 배양상청액에 대하여 25, 70%의 포화도에서 류안분별염색을 진행하고 세파덱스 G-150겔러파크로마토그래프법으로 분리정제하였다.

K_m , V_{max} 는 0.1~10mmol/L의 각이한 피틴산나트륨농도에서 피타제활성을 측정하여 결정하였다.[4]

SDS-PAGE는 선행방법[5]에 준하여 12% 폴리아크릴아미드겔에서 진행하였으며 피타제활성은 몰리브덴청법[3]으로 측정하였다. 피타제활성 1U는 해당 반응조건에서 1min동안에 1 μ mol의 무기린을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 논의

1) 분비형재조합대장균피타제의 분리정제

25, 70%의 포화도에서 류안분별염색하여 얻은 효소를 20mmol/L 트리스-염산완충액 (pH 8.0)에서 탈염시키고 세파덱스 G-150겔탑으로 통과시켜 분획화하였다.(그림 1)

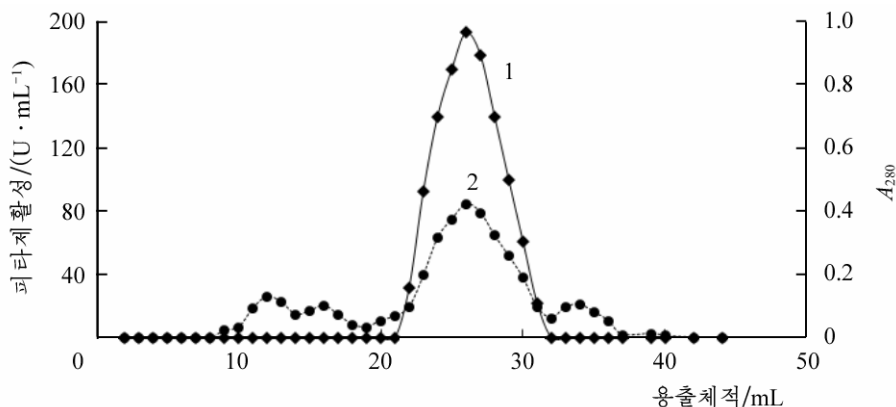


그림 1. 류안염색효소의 세파덱스 G-150겔러파크로마토그램
1-피타제활성, 2-단백질농도; 겔탑 Φ 1.6×22cm, 용출속도 8mL/h, 시료체적 1mL

정제단계별피타제활성 및 단백질량을 표에 종합하였다.

표. 정제단계별피타제활성 및 단백질량

정제단계	단백질량/mg	총활성/U	비활성/(U·mg ⁻¹)	정제도/배	거둠률/%
출발효소	6.0	4 500	750	1.0	100
류안염석	3.7	3 285	900	1.2	73
겔러파	1.3	1 708	1 314	1.8	38

표에서 보는것처럼 분비형재조합균주의 유도배양물상청액으로부터 류안염석과 세파덱스 G-150겔러파크로마토그래프법의 두 단계에 의하여 분비형피타제가 38%의 거둠률로 1.8배 정제되었다.

분리정제에 리용한 배양상청액과 정제된 분비형재조합피타제에 대하여 SDS-PAGE분석을 진행한 결과 분비형재조합피타제가 정확히 분리정제되었다는것을 확인하였다.(그림 2)

대장균은 보통 세포밖으로 단백질을 많이 분비하지 않기때문에 목적유전자의 특이적인 분비형발현을 실현하면 분리정제과정이 간단해질수 있다.

우리가 분리정제에 리용한 배양상청액속의 총단백질중 피타제가 대부분을 차지(SDS-PAGE상에서 50%)하였으므로 류안염석과 겔러파크로마토그래프법만을 리용하여 1.8배로 정제한 피타제가 비교적 순수하다는것을 확인하였다.

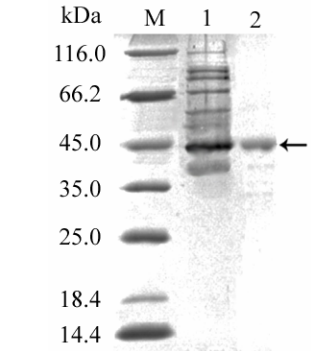


그림 2. 분리정제된 분비형 피타제에 대한 SDS-PAGE상 1-16h 유도배양한 배양물의 상청액, 2-분리정제된 분비형피타제, M-단백질분자량표식자

2) 분비형재조합대장균피타제의 효소학적특성

분비형재조합피타제의 분자량 분리정제된 분비형재조합피타제의 분자량을 SDS-PAGE법으로 결정하였다.

단백질분자량표식자들과 분비형재조합피타제단편의 상대이동도와 분자량의 로그값사이 관계그래프로부터 계산된 분자량은 약 45kDa로서 이 값은 *appA* 자체신호배열과 *kil*의 공발현에 의하여 배지에 분비된 피타제의 분자량[7]과 일치하는 값이다.(그림 3)

기질농도의존성 라인위버-버크그래프로부터 결정한 피틴산나트륨에 대한 K_m , V_{max} 값은 각각 0.361mmol/L, 1 314 μ mol/(min·mg)이다.(그림 4)

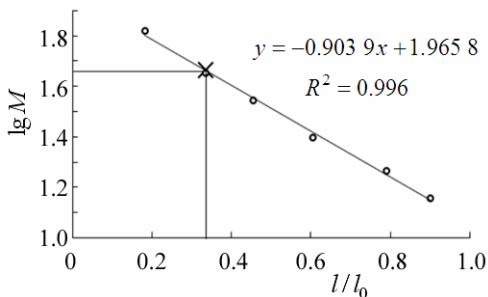


그림 3. 단백질분자량표식자의 상대이동도와 분자량의 로그값사이 관계그래프

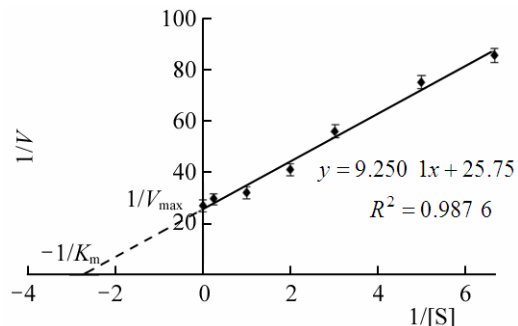


그림 4. 분비형피타제의 라인위버-버크그래프

최적온도와 최적pH 반응온도와 pH에 따르는 효소활성변화를 그림 5와 6에 보여주었다.

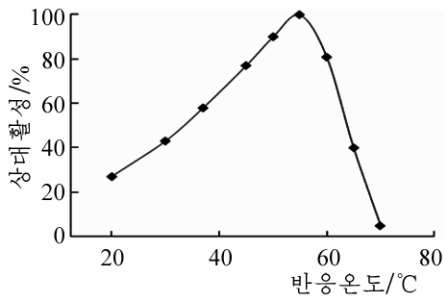


그림 5. 반응온도에 따르는 효소활성변화
pH 4.5, 반응시간 15min

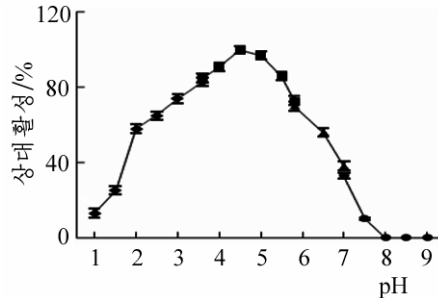


그림 6. pH에 따르는 효소활성변화
pH 1.0~3.6(0.2mmol/L 글리신-염산완충액),
pH 3.6~5.8(0.2mmol/L 초산-초산나트륨완충액),
pH 5.8~7.0(0.2mmol/L 트리스-초산완충액),
pH 7.0~9.0(0.2mmol/L 트리스-염산완충액);
반응온도 37°C, 반응시간 15min

그림 5, 6에서 보는바와 같이 최적온도는 55°C, 최적pH는 4.5이다. 37°C에서의 활성은 최적온도에서의 활성의 47%이고 pH 2.0에서의 활성은 최적pH에서의 활성의 58%정도이다. 이것은 분비형피타제가 동물의 소화관에서 모두 활성을 나타낼수 있다는것을 보여준다.

열안정성과 pH안정성 분비형피타제용액을 40, 50, 60°C에서 0~120min간 처리하고 나머지 활성을 측정하였다.(그림 7)

그림 7에서 보는바와 같이 40°C에서는 2h까지도 그 활성이 높은 수준에서 유지되었고 50°C에서는 43%로 떨어졌다. 60°C에서는 10min만에 활성이 40%정도로 떨어졌다.

일반적으로 대장균피타제는 비활성이 높고 프로테아제저항성이 강한 반면에 열안정성이 낮은 결함을 가지고있다.[6]

피타제를 물고기먹이첨가제로 리용하자면 높은 온도에서의 성형과정을 거쳐야 하므로 분비형피타제의 열안정성을 높여야 한다.

효소용액을 각이한 pH의 완충액에서 1h 처리하고 나머지활성을 측정하여 pH안정성을 보았다.(그림 8)

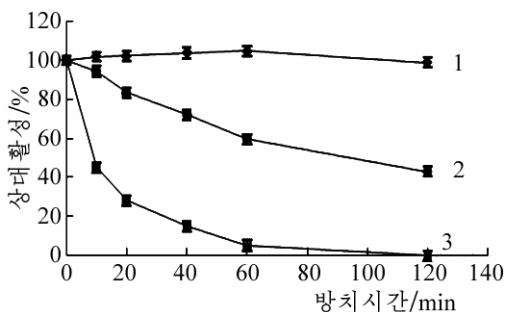


그림 7. 분비형피타제의 열안정성

1—40°C, 2—50°C, 3—60°C; 반응온도 37°C,
반응pH 4.5, 반응시간 15min

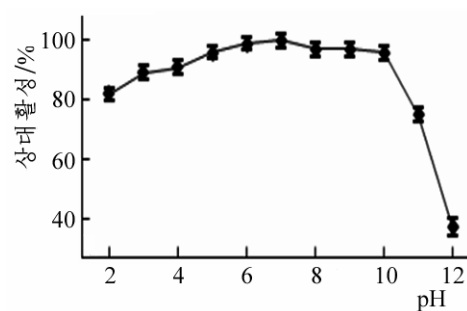


그림 8. 분비형피타제의 pH안정성
pH 2.0~9.0은 그림 6에서와 같은 완충액을 리용함,
pH 9.0~10.0(0.2mmol/L 글리신-가성소다완충액),
pH 11.0~12.0(0.2mmol/L 가성소다용액);
반응pH 4.5, 반응온도 37°C, 반응시간 15min

분비형피타제는 pH 3.0~10.0의 넓은 구간에서 높은 활성을 유지하였다. pH 2.0에서는

70%정도로 활성을 유지하며 pH 12.0에서는 70%의 활성을 잃었다. 이것은 분비형피타제가 소화관의 pH범위에서 효소활성을 안정하게 유지할수 있다는것을 보여준다.

금속이온의 영향 각이한 금속이온이 포함된 반응계에서 분비형피타제의 활성을 측정하고 대조와 비교하는 방법으로 금속이온의 영향을 보았다.(그림 9)

K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 이 분비형피타제에 대하여 활성화작용을 나타내는데 효과가 가장 높은것은 Mn^{2+} 이며 Fe^{2+} 은 효소활성을 강하게 저해한다.

프로테아제저항성 1mL의 분비형피타제(20U/mL)를 1mL의 펩신용액(40U/mL, pH 2.0)과 판크레아틴용액(40U/mL, pH 8.0)에 각각 0~60min동안 방치한 다음 0.1mmol/L의 초산완충액(pH 4.5)으로 희석하여 효소활성을 측정한 결과는 그림 10과 같다.

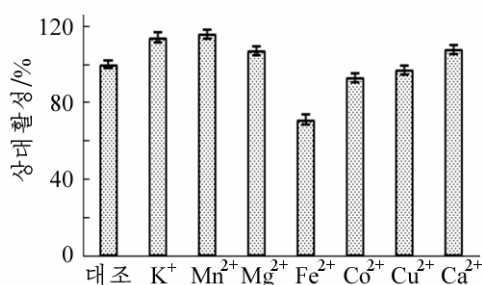


그림 9. 분비형피타제에 미치는 금속이온의 영향

완충액은 0.5mmol/L의 KCl, $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $CaCl_2$ 이 포함된 100mmol/L의 트리스-염산완충액(pH 7.0)

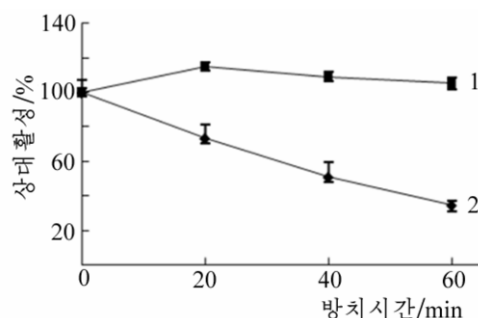


그림 10. 분비형피타제의 프로테아제저항성

1-펩신, 2-판크레아틴; 반응pH 4.5, 반응온도 37°C, 반응시간 15min

그림 10에서 보는것처럼 분비형피타제는 펩신작용에 대해서는 안정하고 판크레아틴에 의해서는 활성을 점차 잃는다.

분비형피타제의 프로테아제저항성은 *Bacillus*피타제나 *Aspergillus*피타제에 비하여 비교적 높다고 볼수 있다.

*Bacillus*피타제는 트립신에 대해서는 안정하지만 펩신에 의해서는 심하게 불활성화된다. 또한 *Aspergillus*피타제는 프로테아제저항성이 매우 약하다.[6]

분비형피타제의 펩신저항성이 높은것은 동물의 소화관에서 작용해야 하는 먹이첨가제로서 매우 우월한 특징으로 된다.

맺는 말

분비형재조합피타제는 류안염석과 세파덱스 G-150겔여과크로마토그래프법의 두 단계에 의하여 38%의 거둢률로 1.8배 정제된다.

분비형재조합피타제의 분자량은 SDS-PAGE상에서 45kDa로 결정되었다. pH 4.5에서 최대활성을 나타내며 40~50°C에서, pH 3.0~10.0의 넓은 구간에서 안정하다. 최적온도는 반응시간 15min일 때 55°C이다.

피틴산나트륨에 대한 K_m , V_{max} 값은 각각 0.361mmol/L, 1 314 μ mol/(min·mg)이다.

분비형재조합피타제는 펩신과 판크레아틴작용에 대하여 안정하다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 8, 110, 주체105(2016).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 11, 119, 주체105(2016).
- [3] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 4, 98, 주체104(2015).
- [4] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 6, 110, 주체105(2016).
- [5] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1~300, 2001.
- [6] X. G. Lei et al.; Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 283, 2013.
- [7] G. Miksch et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 685, 2002.

주체106(2017)년 1월 5일 원고접수

Purification and Characterization of Extracellular Recombinant Phytase from *Escherichia coli*

Kim Song I, Kim Ju Song

The extracellular recombinant phytase is purified 1.8 times with 38% of yield by two steps, ammonium sulfate salting out and Sephadex G-150 gel filtration chromatography.

The molecular weight of purified extracellular recombinant phytase is determined to be 45kDa from SDS-PAGE. It displays the maximal activity at pH 4.5 and remains stable in the broad range of pH 3.0 ~ 10.0 at 40 ~ 50 °C. The optimum temperature of extracellular recombinant phytase is 55°C at reaction time of 15min.

The K_m and V_{max} for sodium phytate are 0.361mmol/L and 1 314 μ mol/(min·mg), respectively.

Extracellular recombinant phytase is resistant to both pepsin and pancreatin inactivation.

Key words: extracellular phytase, sodium phytate, *appA*