

## 열안정성변이형대장균피타제(I427L)의 몇가지 효소학적특성

김복신, 김주성, 김철호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학연구사업과 생산실천을 밀접히 결합시켜야 과학기술도 빨리 발전시키고 과학연구사업에서 이룩한 성과에 기초하여 경제건설도 적극 다그칠수 있습니다.》(《김정일선집》증보판 제15권 492페이지)

먹이첨가제용효소로 널리 리용되는 피타제의 열안정성을 비롯한 효소학적특성을 개선하는것은 생산과 응용에서 나서는 중요한 문제이며 그 해결을 위하여 새로운 피타제유전자를 찾아내는것과 함께 알려진 단백질의 아미노산배열에 변이를 도입하는 단백질공학적인수법이 널리 적용[5, 6]되고있다.

우리는 대장균피타제유전자의 기능개변을 위한 각이한 변이들중에서 열안정성을 향상시키는 우수한 변이점으로 알려진 I427L변이[4]를 *Escherichia coli* 38의 피타제유전자(GenBank 등록번호: KT731135)에 도입하여 재조합발현체를 구축[3]한데 기초하여 얻어진 변이체의 열안정성을 비롯한 몇가지 효소학적특성을 밝히기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

효소학적특성연구를 위한 재료로는 열안정성변이형피타제발현균그루 *E. coli* BL21(DE3) (pET28-appA\_i427l)[3]을 유도배양하여 얻은 세포내가용성상청액에 대하여 류산암모니움염석과 세파덱스 G-150겔러파크로마토그래프법을 거쳐 분리정제한 효소를 리용하였다.

각이한 기질농도에서 피타제활성을 측정하고 라인위버-버크그래프를 작성하여 변이형피타제의  $K_M$ ,  $V_{max}$  값을 결정하였으며 각이한 반응온도와 pH에서 변이형피타제의 활성변화를 측정하여 최적온도와 최적pH를 결정하였다.

변이형피타제와 야생형피타제를 50, 55, 60°C에서 각이한 시간 처리하고 나머지활성을 측정하는 방법으로 열안정성을 비교하였다.

또한 각이한 pH의 완충액에서 변이형과 야생형피타제용액을 2h 처리하고 나머지활성을 측정하는 방법으로 pH안정성을 평가하였다.

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 각이한 금속이온이 0.5mmol/L로 포함된 완충액에서 야생형과 변이형피타제를 방치한 후 활성을 측정하였다.

먹이첨가제로서의 중요한 징표의 하나인 프로테아제분해저항성을 평가하기 위하여 변이형피타제(20U/mL) 1mL를 1mL의 펩신(40U/mL)과 판크레아틴(40U/mL)용액에 각각 0~60min동안 방치한 다음 0.1mmol/L 초산완충액(pH 4.5)으로 희석한 후 나머지활성을 측정하였다. 피타제활성은 변경된 몰리브덴청법[1]으로 측정하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 기질농도의존성과 운동학적상수

라인위버-버크그래프(그림 1)를 작성하여 결정한  $K_M$ ,  $V_{max}$  값은 각각 0.266 mmol/L, 1 280  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 이었다. 즉  $K_M$  값은 야생형(0.364mmol/L)에 비하여 약 73%로 감소하였으며  $V_{max}$  값은 야생형(1 284  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ )과 유사하였다. 이로부터 변이형피타제가 보다 높은 기질친화성을 가질 수 있다는것을 예측할 수 있다.

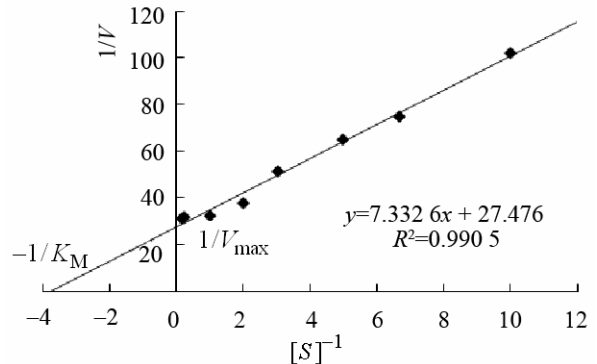


그림 1. 변이형피타제의 라인위버-버크그래프

### 2) 변이형피타제의 최적온도와 최적pH

각이한 반응온도와 pH에서 변이형피타제의 활성변화를 그림 2, 3에서 보여주었다.

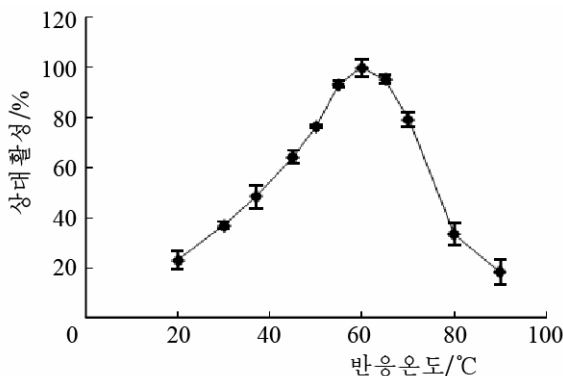


그림 2. 반응온도에 따르는 효소활성변화  
활성측정조건: pH 4.5, 반응시간 15min

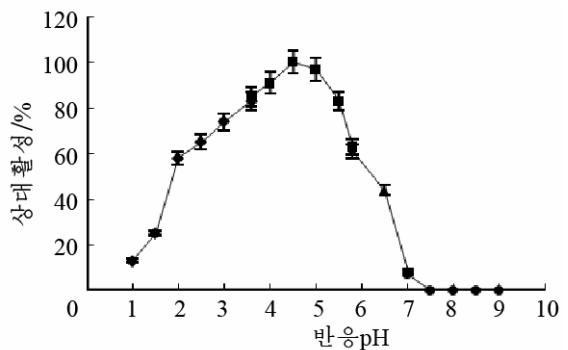


그림 3. 반응pH에 따르는 효소활성변화  
pH 1~3.6(0.2mmol/L 글리신-염산완충액), pH 3.6~5.8(0.2mmol/L 초산-초산나트륨완충액), pH 5.8~7.0(0.2mmol/L 트리스-초산완충액), pH 7.0~9.0(0.2mmol/L 트리스-염산완충액)  
활성측정조건: 반응온도 37°C, 반응시간 15min

그림 2에서 보는바와 같이 피타제활성은 반응온도가 높아짐에 따라 선형적으로 증가하다가 60°C근방에서 완만하게 변화되었으며 65°C이상에서는 급격히 떨어진다. 실험결과 최대활성이 나타나는 온도는 야생형피타제[2]와 같은것으로 나타났지만 활성감소가 급격히 나타나는 온도가 높아진것과 같은 일정한 차이를 가진다.

또한 그림 3에서 보는바와 피타제활성은 pH 4.5에서 최대에 도달하였는데 이것은 야생형피타제의 효소활성변화특성[2]과 유사하다. 37°C에서의 활성은 최적온도 60°C에서의 활성의 48.6%이고 pH 2.0에서의 활성은 최적pH 4.5에서의 47%정도로써 이것은 변이형피타제가 야생형효소와 마찬가지로 각이한 pH를 가진 동물의 소화관에서 충분한 활성을 발휘할 수 있다는것을 보여준다.

### 3) 열안정성 및 pH안정성

변이형피타제와 야생형피타제의 열안정성에서의 차이를 해명하기 위하여 활성감소가 뚜

렛이 일어나는 온도인 50, 55, 60°C에서 효소용액을 처리하면서 시간에 따르는 활성변화를 측정하였다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 50~60°C에서 두가지 효소는 열안정성이 현저하게 차이났는데 열불활성화반감기를 비교하면 변이형효소가 2~5.5배 길었다.(표)

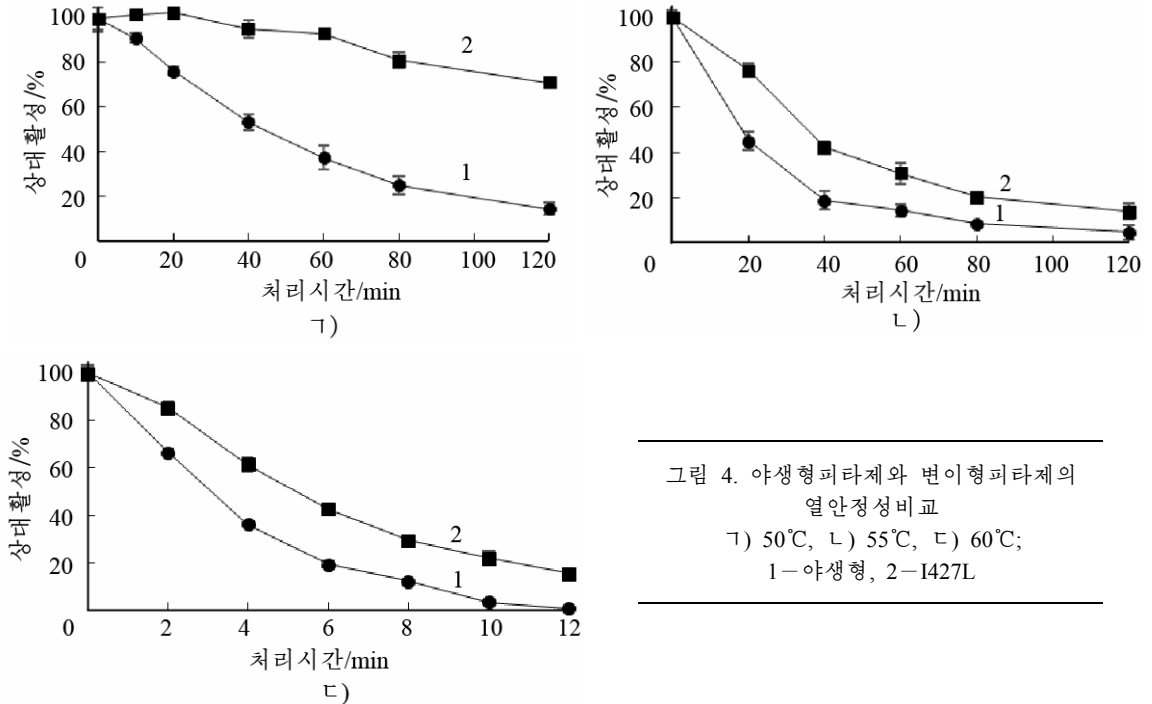


그림 4. 야생형피타제와 변이형피타제의 열안정성비교

ㄱ) 50°C, ㄴ) 55°C, ㄷ) 60°C;

1-야생형, 2-I427L

표. 각이한 처리온도에서 불활성화반감기의 비교

온도/°C	불활성화반감기/min	
	야생형	I427L
50	40.6	226
55	18.9	40.0
60	8.58	17.0

가한 결과 변이형피타제는 pH 2.0에서 84% 정도의 활성이 유지되었으나 pH 12.0에서는 50%이상 불활성화되었다.(그림 5)

야생형피타제의 효소활성이 80%이상 유지되는 pH범위가 3.0~9.0이라는것과 비교해볼 때 변이형피타제가 pH 3.0~11.0에서 안정한것을 통하여 pH안정성이 보다 높아졌다는것을 알수 있다.

#### 4) 금속이온의 영향

각이한 금속이온이 포함된 완충액에 야생형과 변이형피타제를 30min간 방치하

효소용액을 각이한 pH의 완충액에서 2h 처리하고 나머지활성을 측정하여 pH안정성을 평

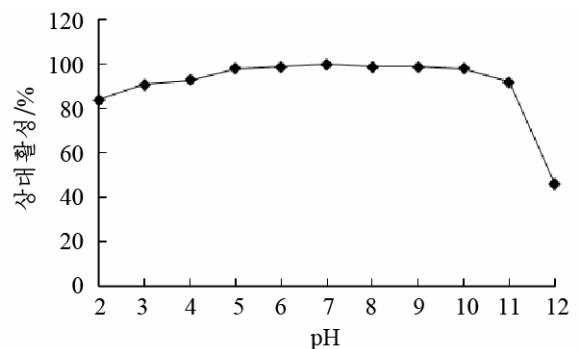


그림 5. 변이형피타제의 pH안정성

pH 1~3.6(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), pH 9.0~10.0(0.2mmol/L 글리신-가성소다완충액), pH 11.0~12.0(0.2mmol/L 가성소다 용액); 활성측정조건: 반응pH 4.5, 반응 온도 37°C, 반응시간 15min

고 활성을 측정하는 방법으로 금속이온의 영향을 조사하였다.(그림 6)

0.5mmol/L의 농도에서  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 이 변이형피타제에 대하여 활성화작용을 나타냈는데 효과는  $Mn^{2+}$ 이 제일 높았으며  $Fe^{2+}$ 은 두가지 피타제에서 공통적으로 효소활성을 저해하였다. 이것은 야생형AppA의 특성[2]과 일치하며 일부 금속이온, 특히  $Fe^{2+}$ 에 의한 억제작용은 완

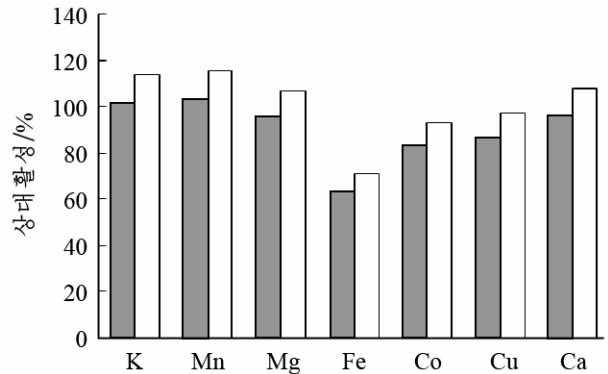


그림 6. 변이형피타제활성에 미치는 금속이온의 영향  
방치완충액: 0.5mmol/L KCl,  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $CaCl_2$ 을 포함한 100mmol/L 트리스-염산 완충액(pH 7.0), ■ 야생형, □ I427L

### 5) 프로테아제분해저항성

1mL의 변이형피타제(20U/mL)를 1mL의 펩신(40U/mL)과 판크레아틴(40U/mL) 용액에 각각 0~60min동안 방치한 다음 0.1mmol/L 초산완충액(pH 4.5)으로 희석한 후 활성을 측정한 결과를 야생형에 대한 실험자료와 함께 그림 7과 8에 보여주었다.

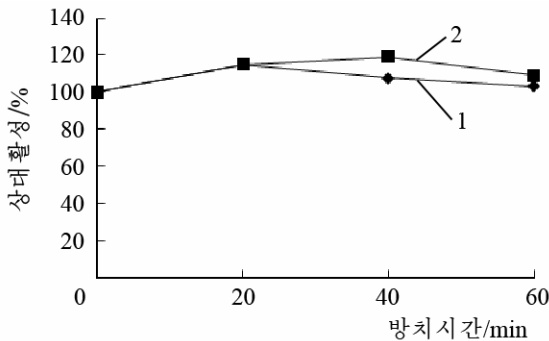


그림 7. 변이형피타제의 펩신분해저항성  
1-야생형, 2-I427L

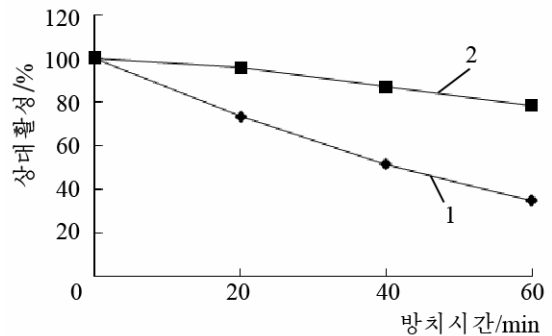


그림 8. 변이형피타제의 판크레아틴분해저항성  
1-야생형, 2-I427L

그림 7, 8에서 보는바와 같이 변이형피타제의 펩신분해저항성은 야생형과 유사하였으나 판크레아틴에 대한 분해저항성은 뚜렷이 증가하였으며 60min처리후의 나머지활성은 2배이상 증가하였다. 변이형피타제의 판크레아틴분해저항성이 높은것은 동물의 위에서뿐만 아니라 12지장 및 소장에서도 작용하면서 피틴분해를 진행할수 있는 가능성을 제공하여주는 것으로 하여 먹이첨가제로서 매우 우월한 특징으로 된다.

## 맺는 말

열안정성변이형피타제발현재조합대장균 *Escherichia coli* BL21(pET28-appA\_i427l)의 유도배양산물로부터 분리정제한 변이형피타제의 효소학적특성은 다음과 같다.

변이형대장균피타제의 피틴산나트륨에 대한  $K_M$ ,  $V_{max}$ 값은 각각 0.266mmol/L, 1 280  $\mu$ mol/(min·mg)로서  $K_M$ 값은 야생형의 약 73%에 해당되며  $V_{max}$ 값은 야생형과 유사하다. 최적온도는 반응시간 15min에서 60°C이고 최적pH는 4.5로서 야생형과 같다.

50~60°C에서 변이형대장균피타제는 야생형에 비하여 현저하게 높은 열안정성을 나타내며 불활성화반감기는 2~5.5배로 늘어나고 야생형에 비하여 더 넓은 pH구간에서 안정하다.

$K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 이 변이형대장균피타제의 활성화에 촉진작용을 하며  $Fe^{2+}$ 은 효소활성을 저해하지만 그 작용정도는 야생형에 비하여 약하다.

변이형피타제의 펩신분해저항성은 야생형과 유사하며 판크레아틴분해저항성은 1h동안 처리한 후 나머지활성이 70%이상으로서 야생형의 약 2배정도이다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 4, 98, 주체104(2015).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 6, 110, 주체105(2016).
- [3] 김복신 등; 생물학, 2, 18, 주체108(2019).
- [4] Weihua Zhu et al.; Curr. Microbiol., 61, 267, 2010.
- [5] X. G. Lei et al.; Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 283, 2013.
- [6] Nathálya Farias et al.; Molecules, 22, 1, 2018.

주체109(2020)년 1월 5일 원고접수

## Enzymatic Characterization of a Thermostable Mutant(I427L) of *Escherichia coli* AppA

Kim Pok Sin, Kim Ju Song and Kim Chol Ho

Compared to the wild type, a mutant I427L showed improved thermostability with 2~5.5 times prolonged half-life for thermal inactivation at 50~60°C. The  $K_M$  and  $V_{max}$  values of mutant were 0.266mmol/L, 1 280mol/(min·mg) respectively. The pH and metal ion dependences were similar to those of the wild type, and the mutant showed a significant resistance against pancreatin, which was about twice as compared with the wild type.

Keywords: AppA, mutant I427L, thermostability, enzymatic characterization