

# 피타제발현재조합대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)의 피타제발현최적화를 위한 연구

허영원, 김일, 김철호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《어떻게 해서든지 첨가제문제를 우리 식으로 풀어야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제20권 294페이지)

식물성먹이속에 들어있는 피틴산(이노시톨-1, 2, 3, 4, 5, 6-헥사린산)을 물작용분해하여 동물이 리용할수 있는 린과 이노시톨로 전환시키는 효소인 피타제에 대한 요구가 높아지고있으며 각이한 원천으로부터 피타제유전자를 분리하고 대량발현시키기 위한 연구[3]가 활발히 벌어지고있다.

우리는 고밀도세포배양에서 피타제발현재조합대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)의 피타제발현률을 높이기 위한 여러 인자들의 영향[1]을 밝힌데 기초하여 품질공학적수법으로 최적유도조건을 확립하기 위한 연구를 하였다.

## 재료 및 방법

재료 균주로는 피타제발현재조합대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)을 리용하였다.

균배양배지로는 다음의것들을 리용하였다.

LB배지(펩톤 1%(w/v), 효모엑스 0.5%(w/v), NaCl 0.5%(w/v), pH 7.0), 합성배지와 첨가배지, 미량원소용액은 선행방법[1]에 따라 준비하였다.

### 균배양방법

종균배양 -20℃에 동결보존하였던 균을 10mL의 LB배지(Kan, 50μg/mL)를 넣은 50mL들이 시험관에 1% 접종하고 6h동안 배양한 다음 160mL의 LB배지(Kan, 50μg/mL)에 1% 접종하여 4~6h동안 배양(OD<sub>600</sub> 2~3)하였다.

탕크배양 초기배양온도를 37℃, pH는 15% 암모니아수로 6.8~7.2 되게 맞추었으며 용존산소(DO)농도는 교반속도와 공기류량을 조절하여 25%로 보장하였다.

배지첨가방법 초기배양에서는 DO일정법으로, 유도배양에서는 지수첨가방법으로 설정한 비증식속도에 맞게 다음의 방정식을 리용하여 첨가배지를 넣어주었다.

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

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 균체거듭들결수이다.

### 분석방법

균체량측정 균체량은 OD<sub>600</sub>, 젖은세포질량( $W_{WC}$ )과 마른세포질량( $W_{DC}$ )을 측정하여 평가

하였다.

활성측정 피타제활성은 변경시킨 물리브덴청법[2]으로 측정하였다. 피타제활성 1U는 해당 조건에서 1min동안에 1 $\mu$ mol의 무기린을 생성하는 효소의 량으로 정의하였다.

## 결과 및 논의

단인자실험결과[1]에 기초하여 인자와 수준(표 1)을 정하고 혼합형직교표  $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ 을 리용하여 실험을 진행하였으며 실험결과에 따라 피타제발현재조합 대장균의 피타제발현수준이 최대로 되는 최적조건을 찾기 위하여 망대특성의 SN비를 구하였다.

변동계산을 위한 보조표를 작성한 결과는 표 2와 같다.

보조표(표 2)와 분산분석표(표 3)로부터 SN비의 최적조건은

$A_2B_1C_2D_2E_1F_3G_2$ 이다. 즉 유도배양온도 25 $^{\circ}$ C, 비중식속도 0.04h $^{-1}$ , 포도당기아시간 20min, 용존산소(DO)농도 15%, 유도제로서 젓당농도 40mmol/L, 유도방식 6차, 유도배양pH 7.2~7.6이다. 또한 재조합대장균의 피타제발현에 중요한 인자들은 비중식속도와 유도배양단계에서 배지의 pH, 유도배양온도, 젓당농도라는것을 알수 있다.

표 1. 인자와 수준

No.	인자	기호	수준		
			1	2	3
1	유도배양온도/ $^{\circ}$ C	A	22	25	—
2	예상비중식속도/h $^{-1}$	B	0.04	0.05	0.06
3	포도당기아시간/min	C	10	20	30
4	용존산소(DO)농도/%	D	10	15	20
5	젓당농도/(mmol·L $^{-1}$ )	E	40	60	80
6	유도차수/차	F	4	5	6
7	유도배양pH	G	6.8~7.2	7.2~7.6	7.6~8.0

표 2. 보조표

수준	인자							
	A	B	C	D	E	F	G	e
1	508.1	348.1	342.8	342.9	344.6	343.0	336.8	342.4
2	518.5	343.0	343.8	344.3	343.8	339.8	346.5	341.8
3		335.5	339.9	339.3	338.2	343.7	343.3	342.3
합 1	026.6	1 026.6	1 026.6	1 026.6	1 026.6	1 026.6	1 026.6	1 026.6

표 3. 분산분석표

인자	$f$	$S$	$V$	기여률 /%
A	1	5.96	5.96	14.33
B	2	13.47	6.74	32.82
C	2	1.37	0.69	
D	2	2.24	1.12	
E	2	4.07	2.04	7.73
F	2	1.47	0.73	
G	2	8.13	4.07	18.57
e	4	0.77	0.19	
(e)	(10)	(5.85)	(0.59)	(26.55)
합		37.49		100

영향이 큰 인자들인 A, B, E, G만으로 최적조건인 공정평균을 구한 결과 공정평균추정값과 믿음성한계는  $\mu=59.73 \pm 1.97$ 이었다.

최적조건에서의 확인실험결과 그림에서 보는바와 같이 배양 (27.1 $\pm$ 0.3)h(유도 (13.5 $\pm$ 0.3)h)에 균체량은 OD $_{600}$  42.5 $\pm$ 0.5, 피타제활성은 (1110 $\pm$ 20)U/mL에 이르렀다. 이때 계산된 SN비값 60.83은 추정된 공정평균값구간에 들어가므로 실험의 재현성이 보장되었다고 볼수 있으며 선행조건[1]에서 얻어진 활성 895U/mL에 비하여 최적조건에서 피타제활성이 24%더 높아졌다.

재조합피타제생산과 관련한 선행연구자료들과 비교한 결과를 표 4에 보여주었다.

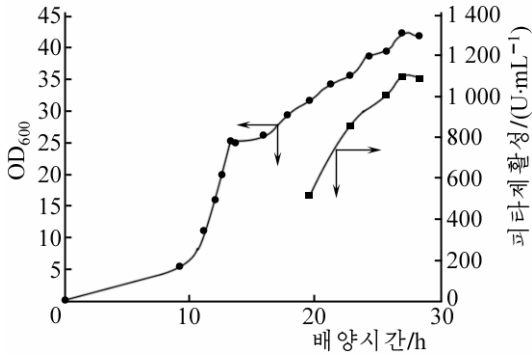


그림. 배양시간에 따르는  $OD_{600}$ , 세포내  
가용성피타제활성변화

배양조건: 포도당기아시간 20min, 비증식속도  
 $0.04h^{-1}$ , 유도온도  $25^{\circ}C$ , 젖당농도 40mmol/L,  
유도차수 5차, 용존산소(DO)농도 15%,  
pH 7.2~7.6

표 4에서 보는바와 같이 고밀도세포배양에서 선행한 재조합대장균의 피타제발현수준은 600U/mL정도이지만 우리가 얻은 재조합균주의 피타제발현활성은 1 110U/mL로서 그보다 훨씬 높은 값이다.

표 4. 고밀도세포배양에서 재조합피타제의  
발현특성비교

발현숙주	세포밀도	활성 (U·mL <sup>-1</sup> )	참고문헌
<i>E. coli</i> BL21	$OD_{600}$ 42.5	1 110	
<i>E. coli</i> BL21	$OD_{600}$ 43.0	600	[4]
<i>E. coli</i> BL21	$W_{DC}$ 57g/L	71	[5]
<i>Pichia pastoris</i>	—	175	[6]
<i>Bacillus subtilis</i>	$W_{DC}$ 56g/L	48	[7]
<i>B. subtilis</i>	$OD_{600}$ 60.1	28.7	[8]

## 맺는 말

피타제발현재조합대장균 *Escherichia coli* BL21(pET-appA)의 고밀도세포배양에서 피타제발현최적조건은 포도당기아시간 20min, 유도온도  $25^{\circ}C$ , 비증식속도  $0.04h^{-1}$ , 젖당 40mmol/L을 6차에 걸쳐 첨가, 용존산소(DO)농도 15%, pH 7.2~7.6으로 보장하는것이며 이 조건에서 유도 13.5h에 균체량은  $OD_{600}$  42.5( $W_{DC}$  약 17g/L), 배양액의 피타제활성은 1 110U/mL로서 최적화전에 비하여 24% 더 높아진다.

## 참고 문헌

- [1] 김일 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 6, 38, 주체105(2016).
- [2] 김일 등; 조선생물공학회지, 1, 5, 주체105(2016).
- [3] X. G. Lei et al.; Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 283, 2013.
- [4] S. Golovan et al.; Can. J. Microbiol., 46, 59, 2000.
- [5] Thi Thuy Tran et al.; J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37, 279, 2010.
- [6] E. Rodriguez et al.; Archives of Biochemistry and Biophysics, 382, 1, 105, 2000.
- [7] Antti Vuolanto et al.; Biotechnology Letters, 23, 7616, 2001.
- [8] J. Kerovuo et al.; Biotechnology Letters, 22, 1311, 2000.

주체105(2016)년 9월 5일 원고접수

## On the Phytase Expression Optima Conditions of the Phytase Expressing Recombinant *Escherichia coli* BL21(pET-appA)

*Ho Yong Won, Kim Il and Kim Chol Ho*

In the HCDC of the phytase expressing recombinant *Escherichia coli* BL21(pET-appA), the optimal induction conditions are as follows: glucose starvation time 20min, induction temperature 25 °C, specific growth rate  $0.04\text{h}^{-1}$ , lactose adding concentration 40mmol/L, 6 times, dissolved oxygen concentration 15%, pH 7.2 ~ 7.6. In these conditions, biomass for 13.5h of induction is  $\text{OD}_{600}$  42.5(DCW 17g/L), phytase activity is 1 110U/mL.

Key words: HCDC, *E. coli*, phytase, optimal induction condition