

재조합피타제의 분비형발현에 미치는 몇가지 배양조건들의 영향

김송이, 김주성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학자, 기술자들은 하면 된다는 신심과 기어이 첨단을 돌파하여 세계를 디디고 올라서겠다는 각오를 가지고 자기 부문에서 첨단수준을 돌파하기 위한 목표를 높이 세우고 힘차게 투쟁해나가야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제24권 453~454페이지)

우리는 대장균피타제유전자(*appA*)의 자체신호배열을 리용한 분비형발현체계를 구축하고 배지에로 재조합피타제가 분비된다는것을 확인[1]한데 이어 그 유도발현에 미치는 몇가지 배양조건 및 유도조건의 영향에 대한 연구를 하였다.

재료 및 방법

균주로는 *appA*의 자체신호배열을 리용하는 분비형피타제발현재조합대장균[1]을 리용하였다.

LB배지(Km 50 μ g/mL)에서 일정한 시간 배양한 재조합균주를 1% 되게 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 200r/min에서 4h동안 초기배양을 진행한 다음 유도제를 첨가하고 해당한 온도에서 유도발현을 진행하였다. 일정한 유도시간에서 배양물을 원심분리(4 $^{\circ}$ C, 10 000r/min, 1min)하고 배양상청액과 세포질가용성분획[2]의 피타제활성을 측정하였다. 피타제활성측정은 변경된 물리브덴청법[2]으로 진행하였다. 피타제활성 1U는 해당 반응조건에서 1min동안에 1 μ mol의 무기린을 생성하는 효소의 량으로 정의하였다.

결과 및 논의

유도배양에 미치는 유도제의 영향을 보기 위하여 각이한 농도의 젖당을 리용하여 25 $^{\circ}$ C에서 16h동안 유도배양하고 배양상청액과 초음파마쇄한 세포질가용성분획의 피타제활성을 측정하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는것처럼 유도제농도가 증가하는데 따라 배양상청액의 활성과 전체 피타제활성은 증가하였으며 8mmol/L에서 최대값에 이르렀다. 그러나 그 이상에서는 오히려 발현량이 줄어들었으며 분비활성도 높지 못하였다. 또한

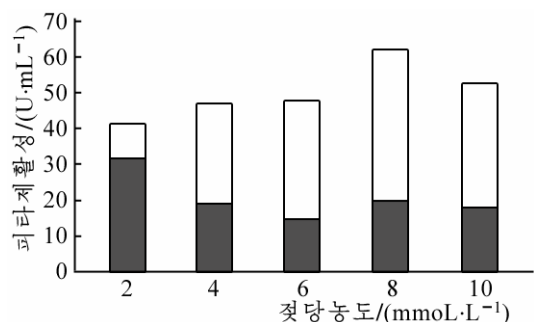


그림 1. 유도제농도에 따르는 피타제활성
□ 배양상청액, ■ 세포질가용성분획

세포질가용성분획에서는 6mmol/L까지는 활성이 줄어들었고 그 이상에서는 15~20U/mL사이에서 유지되었다. 신호배렬을 리용하는 재조합단백질의 분비형발현에 관한 선행연구에서는 유도세기가 낮을수록 분비 및 가용성발현에 유리한것[3]으로 보았지만 재조합피타제의 분비형발현균주는 세포내발현균주[2]와 같은 젖당농도에서 최대활성을 나타내었다. 이것은 신호배렬에 의한 재조합단백질의 분비에서 유도제의 농도를 합리적으로 정하는것이 매우 중요하다는것을 보여준다.

분비형발현에 미치는 종균나이의 영향을 보기 위하여 동결보존하였던 균주를 1% 되게 접종하고 37°C에서 각이한 시간 배양한 배양액을 종균으로 리용하여 유도배양을 진행하고 8mmol/L 젖당으로 25°C에서 16h동안 유도배양을 진행한 다음 배양상청액의 피타제활성을 측정하였다.(그림 2)

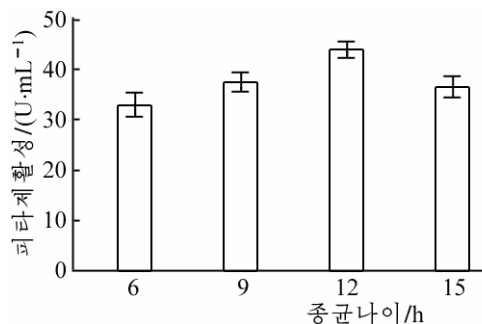


그림 2. 종균나이에 따르는 배양상청액의 피타제활성

그림 2에서 보는바와 같이 배양상청액의 피타제활성은 모두 30U/mL이상이었으며 12h 배양한 종균을 리용하였을 때 그 값이 최대로 되었다. 종균 배양액의 OD₆₀₀이 배양 5h이후로는 4.5정도로 일정하다는것을 고려하면 접종된 균체량은 거의 같았으며 이로부터 분비된 피타제활성의 차이는 곧 종균나이의 차이에 의한것이라는것을 알수 있다. 따라서 다음단계의 실험들에서는 종균나이를 12h로 보장하였다.

배양온도에 따라서 재조합균주의 대사활성과 재조합단백질의 합성 및 분비속도는 각이하게 변화되며 결과 분비량이 큰 영향을 받게 된다. 우리는 8mmol/L 젖당에 의한 유도시작후 각이한 온도에서 배양상청액과 세포질가용성분획에서의 시간에 따르는 피타제활성변화를 보았다.(그림 3)

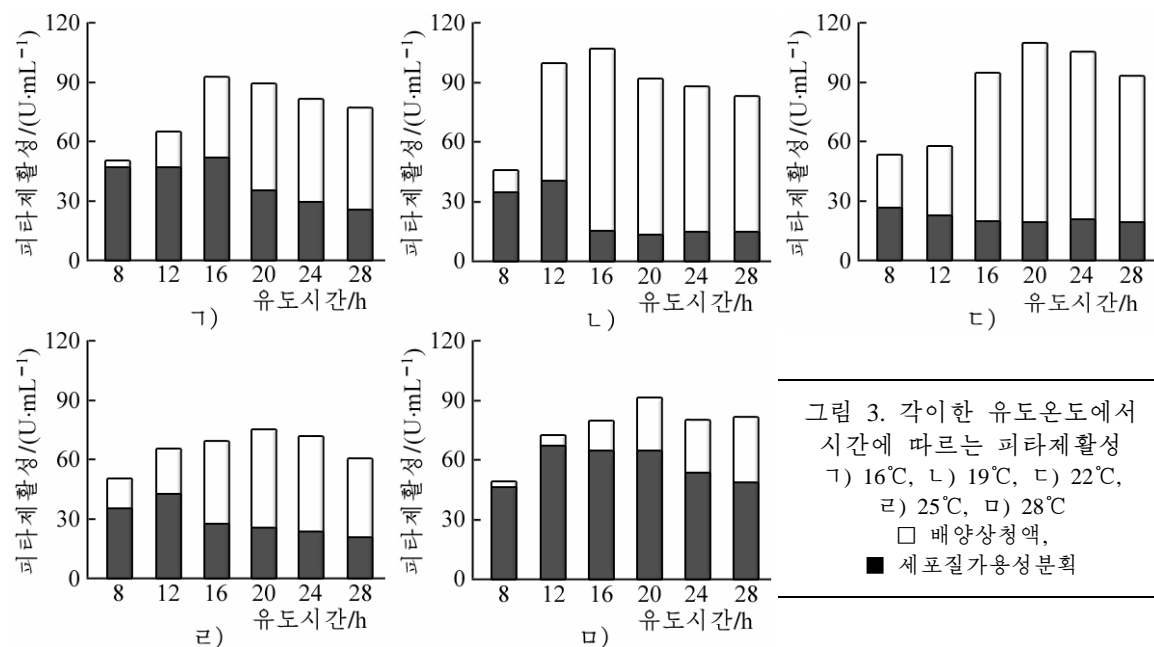


그림 3. 각이한 유도온도에서 시간에 따르는 피타제활성
 ㉠) 16°C, ㉡) 19°C, ㉢) 22°C,
 ㉣) 25°C, ㉤) 28°C
 □ 배양상청액,
 ■ 세포질가용성분획

그림 3에서 보는바와 같이 유도온도를 19℃와 22℃로 보장할 때 배양상청액의 피타제 활성은 유도후 20h내에 최고 각각 91.5, 89.9U/mL에 달하였으며 다음 점차 낮아져 28h에서는 70U/mL정도로 되었다. 그보다 3℃ 높거나 낮은 온도(25, 16℃)들에서는 활성증가속도가 완만하였고 20h만에 최대값(각각 49.6, 53.77U/mL)에 도달하였으며 그후 점차 감소되었다.

또한 유도온도에 따라 실험구들사이에서 세포질가용성분획의 피타제활성은 크게 차이났다. 배양상청액과 세포질가용성분획의 피타제활성을 비교하여보면 유도온도가 22℃일 때 세포질에서의 피타제활성은 8h동안 유도하였을 때의 26.6U/mL로부터 점차 감소하였고 28h까지 20U/mL근방에서 유지되었으며 한편 배양상청액에 분비된 피타제는 20h까지 89.9U/mL로 계속 증가하였고 그 이후에는 74.2U/mL까지 낮아졌다.

이로부터 이 온도에서 재조합피타제의 합성과 분비가 동시에 진행된다는것을 알수 있다. 그러나 유도온도 28℃에서는 유도시간 12h부터 28h사이에서, 유도온도 19℃에서는 유도시간 12h부터 16h사이에서 균체의 활성이 낮아지는데 따라 분비된 양이 증가하였다. 또한 세포질가용성분획의 피타제활성이 높은 경우에는 배지에 분비된 피타제의 최대활성이 더 낮았다.

이러한 실험결과들은 자체신호배열을 리용하는 분비형재조합균주에서의 효소단백질의 분비물립새가 단순히 신호배열과 분비경로에 의한 능동적인 수송 혹은 세포막의 투과성변화나 용균현상에 의한 비특이적인 새어나가기와 같은 분비물립새들중 어느 한가지에만 전적으로 의존하는것이 아니라 그것들의 복합작용속에 진행되는 복잡한 과정[4]이라는것을 보여준다.

각이한 유도온도에서 분비된 피타제활성의 최대값과 그것이 전체 활성에서 차지하는 백분율을 보았다.(표)

표에서 보는것처럼 유도온도에 따라서 배양상청액의 피타제활성과 분비율은 크게 차이났으며 22℃와 19℃에서 분비율이 80%이상 보장되었다.

단실위동물의 린 및 광물질영양개선에서 큰 의의를 가지는 피타제의 분비형발현을 유전자재조합을 통하여 실현하기 위한 연구가 진행[6]되었으나 배양액으로 분비된 피타제활성이 0.42U/mL로 매우 낮은것으로 하여 실천에

표. 유도온도에 따르는 분비활성과 분비율			
유도온도/℃	전체 활성 /(U·mL ⁻¹)	배양상청액 /(U·mL ⁻¹)	분비율/%
28	90.7	33.0	36.4
25	85.2	49.6	58.2
22	109.0	89.9	82.5
19	106.4	91.5	86.0
16	93.0	53.8	57.8

적용할 가치가 없었으며 대장균에서 pET계열의 운반체를 리용하여 *kil*유전자를 공발현시키면서 대장균피타제를 분비형으로 발현시킨 실험[5]에서는 TB배지에서 IPTG유도 30h만에 50U/mL의 피타제를 분비시켰다. 이번에 우리는 자체신호배열만을 리용하여 LB배지에서 16h만에 90U/mL이상의 피타제를 분비시켰는데 이것은 배지의 원가나 유도시간, 효소활성 등의 모든 측면에서 신호배열을 리용한 분비가 *kil*유전자공발현에 의한것보다 우월하다는것을 보여준다.

맺 는 말

대장균피타제유전자(*appA*)의 자체신호배열을 리용한 분비형재조합발현숙주의 피타제발현수준을 높이고 배양상청액에 분비되는 피타제량을 늘이기 위해서는 종균배양시간을 12h, 유도제인 젖당의 농도를 8mmol/L, 유도온도를 19°C로 보장해주는것이 유리하다. 이때 유도 16h만에 배양상청액의 피타제활성은 91.5U/mL정도 되는데 이것은 전체 재조합피타제활성의 86.0%이다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 8, 110, 주체105(2016).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 4, 98, 주체104(2015).
- [3] Bingmiao Gao et al.; Toxicon, 72, 81, 2013.
- [4] F. J. M. Mergulhao et al.; Biotechnology Advances, 23, 177, 2005.
- [5] G. Miksch et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 685, 2002.
- [6] Lei Wang et al.; Int. J. Mol. Sci., 15, 12842, 2014.

주체105(2016)년 7월 5일 원고접수

Effect of Several Fermentation Conditions on Secretary Expression of the Recombinant Phytase

Kim Song I, Kim Ju Song

To improve the expression and secretion of recombinant phytase by the recombinant strain using the natural signal peptide of *appA*, the seed age should be 12h, lactose concentration should be 8mmol/L, and the induction temperature should be 19°C. In the above condition, the phytase activity in medium is 91.5U/mL, which is 86.0% of the total activity.

Key words: *appA*, cultivation, secretion, signal peptide