

재조합대장균피타제의 몇가지 효소학적특성

최연아, 김철호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학연구사업을 더욱 강화하여 세포공학과 유전자공학, 초고압물리학, 극저온물리학을 발전시키며 레이자와 플라즈마기술, 원자에너지와 태양에너지를 개발하여 인민경제에 받아들이는데서 나서는 과학기술적문제를 적극 풀어나가야 하겠습니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 139페이지)

우리는 대장균피타제유전자를 클론화[2]하고 대장균에서 발현[1]시킨데 이어 그 특성을 검토하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

재조합균주 *Escherichia coli* BL21(pET-appA38)[1]를 유도배양하고 균체를 초음파마쇄하여 얻은 효소용액을 25%와 70% 포화도에서 효소용액에 대한 류산암모니움분별염석을 진행하고 탈염한 후 Ni-NTA친화성크로마토그래프법[4]으로 분리정제하여 얻은 분획을 피타제특성연구에 리용하였다.

SDS-PAGE는 선행방법[3]에 준하여 12% 겔에서 진행하였다. 단백질분자량표식자로는 100kD Ladder(《Thermo》)를 리용하였다.

피타제활성은 선행방법[1]에 준하여 측정하였다.

K_m , V_{max} 는 12.5mmol/L까지의 각이한 피틴산나트륨농도에서 반응시간에 따르는 효소활성을 측정하여 계산하는 방법으로 결정하였다.

최적온도는 20~90℃의 온도구간에서, 최적pH는 pH 2.0~10.0의 구간에서 보았다.

열안정성은 30~80℃의 각이한 온도에서 효소를 0~120min 처리하고 활성을 측정하는 방법으로, pH안정성은 pH 2.0~12.0사이에서 각이한 완충액에 효소를 2h동안 방치하였다가 활성을 측정하는 방법으로, 프로테아제저항성은 펩신(1 000U/mL) 및 트립신(1 000U/mL)용액에 효소를 0~60min동안 방치하였다가 나머지활성을 측정하는 방법으로 검토하였다.

효소활성에 미치는 금속이온의 영향은 각이한 금속이온들의 존재(0.5mmol/L)하에서 30min동안 방치하였다가 활성을 측정하여 평가하였다.

결과 및 논의

재조합피타제의 분자량 결정 재조합대장균피타제(AppA)의 분자량을 결정한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 SDS-PAGE에 의해 결정된 재조합피타제의 분자량은 50 000 근방으로서 유전자배열[1]로부터 예측한 결과와 일치하였다.

운동학적상수 결정 각이한 기질농도에서 피타제활성을 측정한 결과 효소반응은 전형적인 미카엘리스-멘텐형의 반응특성을 나타냈는데 라인위버-버크그래프를 작성하여 K_m , V_{max} 를 결정하였다.(그림 2)

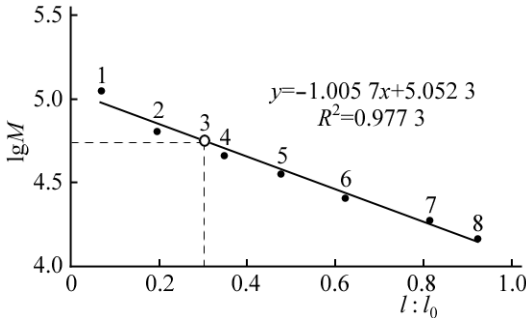


그림 1. SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동에 의한 재조합피타제의 분자량결정

1- β -갈락토시다제(116 000), 2-소혈청알부민(66 200), 3-재조합피타제, 4-알알부민(45 000), 5-젖산수소효소(35 000), 6-RE아제 Bsp931(25 000), 7- β -락토글로불린(18 400), 8-리조짐(14 400)

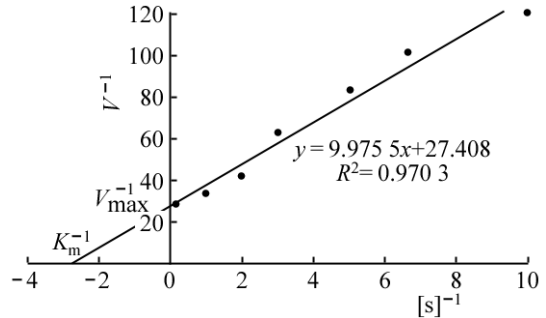


그림 2. 재조합피타제의 라인위버-버크그래프

재조합피타제의 피틴산나트륨에 대한 K_m , V_{max} 는 각각 0.364mmol/L, 1 284 μ mol/(min·mg)으로서 선행연구에서 밝혀진 AppA의 운동학적상수들의 일반적인 범위에 들어갔다.[4-7]

최적온도 및 최적pH 반응온도와 pH에 따르는 재조합피타제의 활성변화를 그림 3, 4에 주었다.

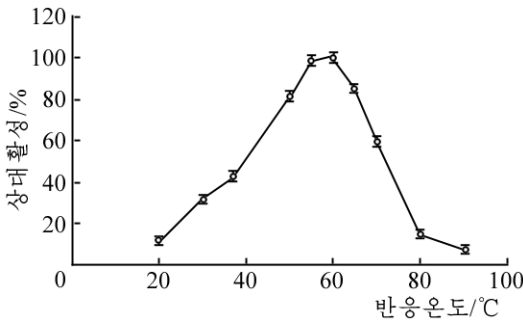


그림 3. 반응온도에 따르는 효소활성변화

활성측정조건: pH 4.5, 15min

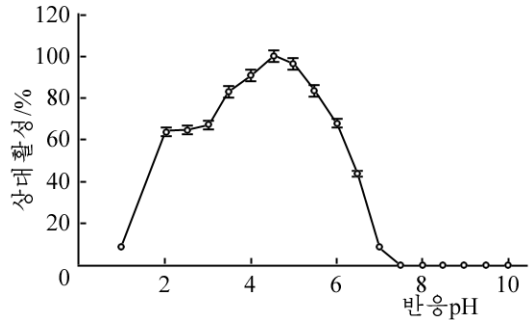


그림 4. 반응pH에 따르는 효소활성변화
pH 1.0~3.5(0.2mol/L 글리신-염산완충액), pH 3.5~6.0(0.2mol/L 초산-초산나트륨완충액), pH 6.0~7.0(0.2mol/L 트리스-초산완충액), pH 7.0~9.0(0.2mol/L 트리스-염산완충액), pH 9.0~10.0(0.2mol/L 글리신-가성소다완충액);
반응온도 37°C, 반응시간 15min

그림 3, 4에서 보는바와 같이 재조합피타제는 60°C 근방과 pH 4.5 근방에서 최대활성을 나타내었다. pH 2.0 근방에서의 활성은 최적pH에서의 활성의 60%이상이었다. 이것은 전형적인 히스티딘산성포스파타제(HAP)의 특성으로서 선행연구자들의 연구결과와 대체로 일치한다.[4-8]

재조합피타제의 이러한 특성은 각이한 pH를 가진 동물의 여러 소화기관에서 활성을 발휘할수 있는 유리한 점으로 된다. 즉 입안(타액pH 5.0~7.0)과 위(pH 2.0~2.5) 및 12지장상부(pH 4.0~6.0)에서 모두 활성을 발휘할수 있는것으로 하여 먹이첨가제로서 우월한 잠재력을 가진것으로 볼수 있다.

열안정성 및 pH안정성 효소용액을 각이한 온도에서 10, 20, 40, 60min 또는 그 이상 처리하고 나머지활성을 측정하는 방법으로 열안정성을 평가하였다.(그림 5)

그림 5에서 보는바와 같이 50℃까지는 효소가 비교적 안정하였지만 60℃이상부터는 불활성화가 심하게 나타났다. 70~80℃에서는 열처리 10min만에 효소활성이 10%미만으로 급속히 떨어졌다. 먹이가공과정에 특히는 물고기류의 알먹이성형과정에 비교적 높은 온도처리를 거친다는것을 고려할 때 앞으로 재조합피타제의 열안정성을 높이기 위한 연구가 더 진행되어야 할것이다.

효소용액을 각이한 pH의 용액에서 2h동안 처리하고 나머지활성을 표준조건(37℃, pH 4.5)에서 측정하는 방법으로 pH안정성을 검토하였다.(그림 6)

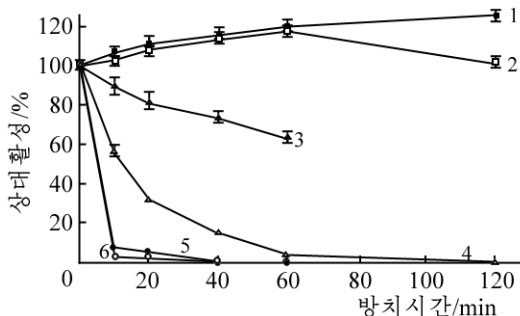


그림 5. 재조합피타제의 열안정성

1-30℃, 2-40℃, 3-50℃, 4-60℃, 5-70℃,

6-80℃; 활성측정조건: 37℃, pH 4.5, 15min

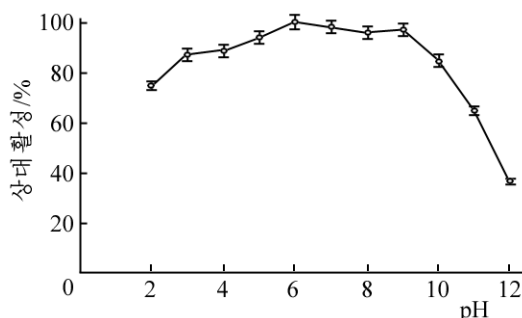


그림 6. 재조합피타제의 pH안정성

pH 2.0~3.5(0.2mol/L 글리신-염산완충액), pH 3.5~6.0(0.2mol/L 초산-초산나트륨완충액), pH 6.0~7.0(0.2mol/L 트리스-초산완충액), pH 7.0~9.0(0.2mol/L 트리스-염산완충액), pH 9.0~10.0(0.2mol/L 글리신-가성소다완충액), 효소방치시간 2h, 활성측정조건 37℃, pH 4.5, 15min

그림 6에서 보는바와 같이 pH 3.0~10.0의 넓은 구간에서 본래의 활성의 85%이상되는 높은 활성을 유지하였으며 강산성인 pH 2.0에서도 75%정도 유지되었다. 이것은 재조합피타제가 비교적 pH안정성이 높다는것을 보여준다.

금속이온의 영향 K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 이 0.5mmol/L농도에서 재조합피타제에 대하여 활성화작용을 나타냈는데 그 효과성순서는 $Mn^{2+} > Mg^{2+} > K^+ > Ca^{2+}$ 이었다. Co^{2+} , Cu^{2+} 은 효소작용을 저해하였으며 특히 Fe^{2+} 은 효소작용을 강하게 저해하였다.(표) 이러한 경향성은 선행연구에서 보고된 HAP의 특성과 대체로 일치하는것이다.[7]

표. 재조합피타제의 활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온	대조	K^+	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Ca^{2+}
상대활성/%	100	117	137	127	73	97	93	107

완충액: 0.5mmol/L KCl, $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $CaCl_2$ 을 포함한 100mmol/L 트리스-염산완충액(pH 7.0), 효소방치시간 30min

단백질분해효소저항성 1mL의 재조합피타제(10U/mL)를 1mL의 펩신(1 000U/mL)과 트립신(1 000U/mL)용액에 각각 0~60min동안 방치한 다음 0.1mol/L 초산완충액(pH 4.5)으로 희석한 후 활성을 측정한 결과는 그림 7과 같다.

그림 7에서 보는바와 같이 재조합피타제는 펩신 및 트립신작용에 대한 비교적 높은 저항성을 나타내었다. 트립신용액에 60min동안 방치하였을 때 활성을 90%이상 유지하였으며 펩신용액에 60min동안 방치하였을 때 활성이 80% 정도로 감소되었다.

지금까지 연구된 자료에 의하면 그 기원에 따라 프로테아제저항성이 크게 차이난다. 특히 *Aspergillus*속 곰팡이의 피타제는 프로테아제저항성이 상대적으로 낮으며 *Bacillus*속 세균의 피타제는 트립신에 대한 저항성은 비교적 높았지만 펩신에 대한 저항성이 매우 낮았다.[7]

AppA₃₈의 프로테아제저항성은 미생물유래의 다른 피타제들과 대비해볼 때 비교적 높은 수준이라고 말할수 있다.

이상의 연구를 통하여 재조합피타제의 효소학적특성을 밝힘으로써 먹이첨가제용효소로서의 리용가능성을 확증하였다.

E. coli 38[2]로부터 클론화한 재조합피타제는 다른 미생물유래의 피타제들에 비해 비활성이 매우 높으며(*A. niger*피타제의 8배이상, *B. subtilis*피타제의 100배정도) 최적pH가 4.5로서 보다 산성쪽으로 치우쳐있다. 특히 pH 2.0에서 최적pH에서의 60%이상에 해당하는 활성을 나타내는것으로 하여 단실위동물의 위의 산성조건에서도 효과적으로 작용할수 있다. 재조합피타제는 또한 프로테아제저항성에 있어서 다른 미생물유래의 피타제들보다 우월한것으로 평가할수 있다. 이러한 특성들은 먹이첨가제용효소로서 우월한 특성으로 된다.

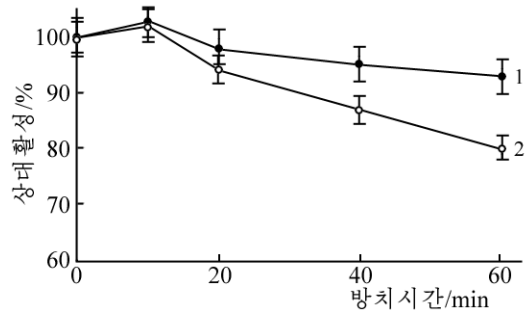


그림 7. 재조합피타제의 단백질분해 효소저항성
1-트립신, 2-펩신

맺 는 말

1) 재조합균주 *E. coli* BL21(pET-appA38)에서 분리한 피타제의 K_m 은 0.364mmol/L이고 V_{max} 는 1 284 μ mol/(min·mg)이며 분자량은 50 000이다. 효소반응의 최적온도 및 최적pH는 각각 60°C, pH 4.5이다.

2) K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 은 0.5mmol/L농도에서 재조합피타제에 대해서 활성화작용을 한다.

3) 재조합피타제는 펩신 및 트립신처리에 대해서 안정하다.

참 고 문 헌

[1] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 4, 98, 주체104(2015).

[2] 최연아 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 58, 주체104(2015).

[3] U. K. Laemmili et al.; Nature, 227, 680, 1970.

- [4] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1~300, 2001.
- [5] G. Miksch et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 685, 2002.
- [6] S. Golovan et al.; Can. J. Microbiol., 46, 59, 2000.
- [7] X. G. Lei et al.; Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 283, 2013.
- [8] F. A. Igbasan et al.; Arch. Anim. Nutr., 53, 353, 2000.

주체105(2016)년 2월 5일 원고접수

Some Enzymatic Characteristics of Recombinant *E. coli* Phytase

Choe Yon A, Kim Chol Ho

Recombinant *E. coli* phytase was isolated from *E. coli* BL21(pET-appA38), its K_m is 0.364mmol/L, V_{max} is 1 284 μ mol/(min·mg) and molecular weight is 50 000. The optimum temperature and pH for the enzyme reaction were 60°C, pH 4.5 respectively. 0.5mmol/L of K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} can activate the recombinant phytase. The enzyme is stable against the treatment by pepsin or trypsin.

Key words: *E. coli* phytase, enzymatic characteristics