

재조합고초균피타제의 분리정제와 몇가지 효소학적특성

김철호, 김주성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현대과학기술의 빠른 발전은 기초과학의 성과에 토대하고있으며 과학기술분야에서의 자립성은 기초과학분야에서부터 시작됩니다.》(《김정일선집》 증보판 제10권 485페이지)

우리는 *Bacillus subtilis* A1731의 게놈으로부터 클론화한 피타제유전자의 재조합발현체를 구축[3]한데 기초하여 재조합고초균피타제의 효소학적특성을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

효소원천으로는 고초균피타제발현재조합대장균 *E. coli* Rosetta Gami(pET-phyNH)[3]의 유도배양산물을 리용하였다. 50mL의 LB배지에서 유도배양한 균체의 초음파마쇄물을 원심분리(4 800r/min, 10min)하여 얻은 상청액에 대하여 25, 70% 포화도에서의 류산암모니움 분별염석과 Ni-NTA수지(《Qiagen》)를 리용한 고정화금속이온친화성분리정제를 진행하였다.

SDS-PAGE는 선행방법[6]에 준하여 12% 겔에서 진행하였으며 피타제활성은 몰리브덴 청법[7]으로 측정하였다.

결과 및 논의

1) 고초균피타제의 분리정제

25, 70% 포화도에서 류산암모니움분별염석하여 얻은 효소를 20mmol/L 트리스-염산 완충용액(pH 8.0)에서 투석하여 탈염시키고 Ni-NTA수지를 리용한 고정화금속이온친화성 크로마토그래프법(IMAC)으로 분획화하였다. 류산염석효소의 고정화금속이온친화성 크로마토그램은 그림 1과 같다.

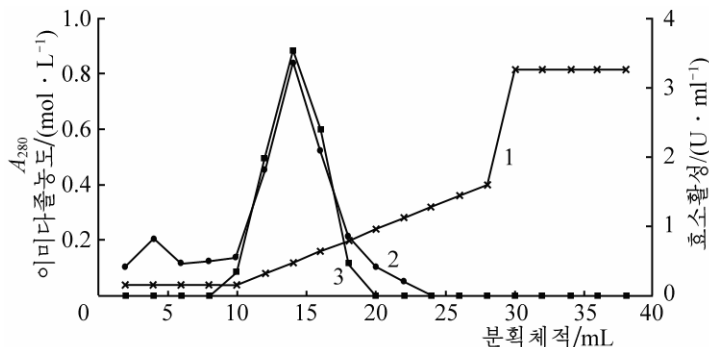


그림 1. 류산염석효소의 고정화금속이온친화성크로마토그램
1-이미다졸농도, 2-A₂₈₀, 3-효소활성; 용출속도 10mL/h

정제단계별 피타제활성 및 단백질량변화를 표 1에 종합하였다.

표 1. 재조합고초균피타제의 분리정제

정제단계	체적 /mL	총단백질량 /mg	총활성 /U	비활성 /(U·mg ⁻¹)	정제도 /배	거둠률 /%
출발효소액	50.0	14.9	43.6	2.9	1.00	100.0
류산암모늄염석 및 투석	12.0	9.1	34.6	3.8	1.30	79.4
Ni-NTA IMAC	6.0	1.2	15.9	13.3	4.53	36.5

표 1에서 보는바와 같이 재조합균주의 유도배양상청액으로부터 류산암모늄염석과 Ni-NTA IMAC 두 단계의 분리정제과정에 고초균피타제가 36.5%의 거둠률로 4.53배 정제되었다.

초음파마쇄상청액속의 총단백질 중 목적발현산물인 피타제가 상당한 몫을 차지하였기 때문에(SDS-PAGE상에서 20%이상[4]) 류산암모늄염석과 IMAC법으로 4.53배 정제하여 SDS-PAGE상으로 순수한 정제품을 얻어내었다.(그림 2) 정제품의 비활성은 13.3U/mg으로서 일반적인 고초균피타제의 비활성범위[5]에 들어간다.

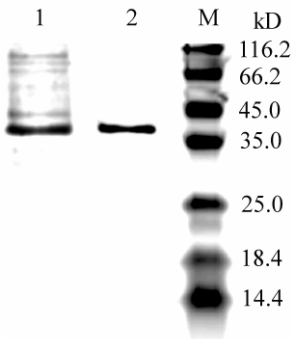


그림 2. 분리정제된 고초균 피타제에 대한 SDS-PAGE
1-초음파마쇄상청액, 2-분리
정제된 고초균피타제, M-단백
질분자량표식자

2) 고초균피타제의 효소학적특성

고초균피타제의 분자량 그림 2에서 단백질분자량표식자들과 고초균피타제의 상대이동도와 분자량의 로그값사이 관계그래프로부터 계산한 분자량은 약 41kD로서 이 값은 고초균피타제의 성숙펩티드암호화령역을 발현하는 재조합운반체의 배렬정보[3]로부터 계산된 예견분자량 41.06kD와 일치하였다.(그림 3)

pH의 영향 pH안정성은 해당한 완충용액에서 효소를 2h동안 방치한 후 나머지활성을 측정하는 방법으로 결정하였다. 각이한 pH에서 고초균피타제의 활성과 안정성을 그림 4에 보

여주었다.

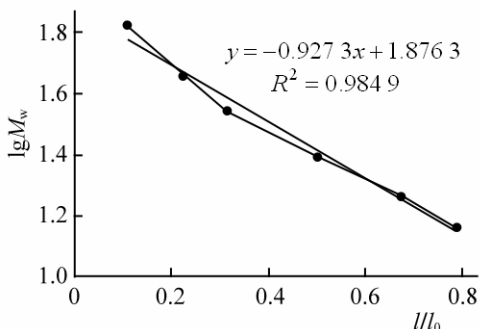


그림 3. 단백질분자량표식자의
상대이동도와 분자량의 로그값
사이관계그래프

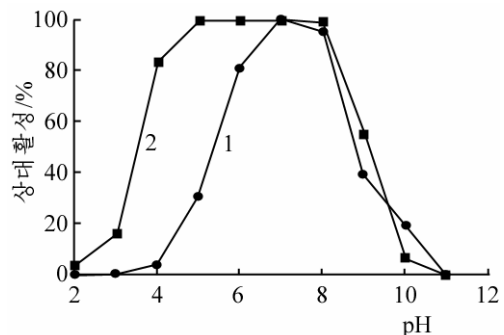


그림 4. pH에 따르는 효소활성과 안정성

1-효소활성, 2-효소안정성; pH 2.0~3.0: 0.2mmol/L 클리신-염산완충용액, pH 4.0~5.0: 0.2mmol/L 초산-초산나트륨완충용액, pH 6.0~7.0: 0.2mmol/L 트리스-초산완충용액, pH 8.0: 0.2mmol/L 트리스-염산완충용액, pH 9.0~10.0: 0.2mmol/L 클리신-NaOH완충용액, pH 11.0: 0.2mmol/L NaHCO₃-Na₂CO₃완충용액

그림 4에서 보는바와 같이 고초균피타제의 최적pH는 7.0이고 4.0~8.0의 pH구간에서 안정하다. pH 5.0에서 상대활성은 최대값의 30.4%이며 중성 및 약알칼리성에서 안정하므로 소장안에서 효과적으로 작용할수 있다.

최적온도와 열안정성 온도에 따르는 효소활성은 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 최적온도는 65°C이며 그 이상의 온도에서는 활성이 완만하게 낮아졌으며 80°C에서도 최대활성의 50%이상을 나타냈다. 이것은 고초균피타제가 열에 안정하다는것을 말해준다.

고초균피타제용액을 50, 60, 70, 80°C에서 0~120min 처리하고 나머지활성을 측정하는 방법으로 열안정성을 평가하였다.(그림 6)

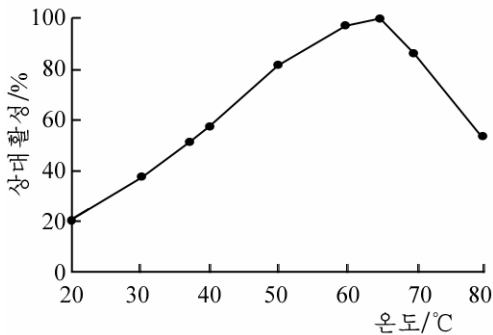


그림 5. 온도에 따르는 효소활성

활성측정조건: pH 7.0, 15min

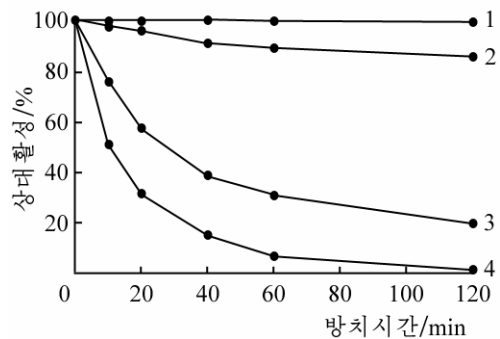


그림 6. 방치온도와 시간에 따르는 효소활성변화

1-4는 방치온도가 각각 50, 60, 70, 80°C인 경우;

활성측정조건: pH 7.0, 37°C, 15min

그림 6에서 보는바와 같이 60°C에서는 2h까지 활성이 높은 수준에서 유지되며 70°C에서는 19.5%로 떨어진다. 80°C에서는 20min만에 활성이 30%정도로 떨어진다. 일반적으로 고초균피타제는 다른 미생물기원의 피타제들에 비하여 열안정성이 높다.[8] 그것은 단백질분자의 열안정성이 높으며 또한 변성되었던 분자가 칼시움이온의 존재하에 효과적으로 재구조화되는것과 관련된다.[1] 피타제를 먹이첨가제 특히 물고기먹이첨가제로 리용할 때에는 높은 온도에서의 성형과정을 거쳐야 한다. 이런 점을 고려할 때 고초균피타제의 높은 열안정성은 먹이첨가제로서의 응용목적에 부합된다.

금속이온의 영향 칼시움이온과 함께 여러가지 금속이온이 포함된 반응계에서 활성을 측정하고 대조와 비교하는 방법으로 활성에 미치는 금속이온의 영향을 보았다.(그림 7)

그림 7에서 보는바와 같이 Cr^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 에 의하여 고초균피타제의 활성이 원래활성의 70~80%까지 낮아지며 특히 Cd^{2+} 에 의하여 활성이 완전히 억제된다. 다른 금속이온들은 효소활성에 별다른 영향을 미치지 않았으며 이것은 먹이첨가제로 리용되는 경우 금속염첨가제리용에서 고려하여야 할 특성으로 된다.

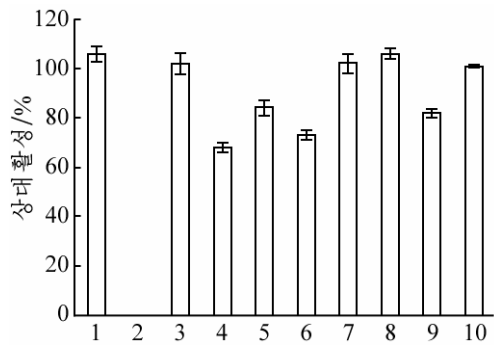


그림 7. 고초균피타제에 대한

금속이온의 영향

1-Ba²⁺, 2-Cd²⁺, 3-Co²⁺, 4-Cr²⁺, 5-Cu²⁺,
6-Hg²⁺, 7-K⁺, 8-Mg²⁺, 9-Mn²⁺, 10-Na⁺;
각종 금속의 염화물을 1mmol/L 되게 첨가

프로테아제저항성 1mL의 고초균피타제(2U/mL)를 1mL의 펩신용액(40U/mL, pH 2.0)과 판크레아틴용액(40U/mL, pH 8.0)에 각각 60min동안 방치한 다음 0.2mmol/L 트리스-초산 완충용액(pH 7.0)으로 희석한 후 활성을 측정하였다.(그림 8)

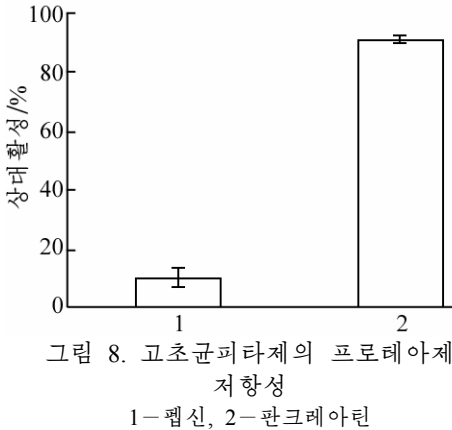


그림 8. 고초균피타제의 프로테아제 저항성
1-펩신, 2-판크레아틴

그림 8에서 보는바와 같이 고초균피타제는 판크레아틴작용에 대하여서는 안정하지만 펩신에 의하여서는 활성을 크게 잃는다. 펩신에 의한 활성저하는 부분적으로는 낮은 pH에 의한것이라고도 볼수 있으며 고초균피타제를 먹이첨가제로 리용하는 경우에는 소장부분에서 작용하도록 하는 것이 합리적이라는것을 알수 있다.

이상과 같이 우리는 고초균피타제를 분리정제하고 그 효소학적특성을 검토한 결과 대장균피타제[2]에 비하여 열안정성이 높은 반면에 펩신저항성은 낮다는것을 알수 있었다.

맺 는 말

고초균피타제는 류산암모늄염석과 Ni-NTA IMAC의 두 단계의 분리정제과정에 36.5%의 거둢률로 4.53배 분리정제되었다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE상에서 단일띠로 나타났으며 분자량은 약 41kD였다.

최적pH는 7.0이고 pH 4.0~8.0에서 비교적 안정하며 효소반응시간 15min일 때 최적온도는 65°C로서 열안정성이 높다. Cr^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 은 효소활성을 저해하며 Cd^{2+} 에 의하여 활성이 완전히 억제된다.

고초균피타제는 판크레아틴에 대하여서는 안정하고 펩신에 의하여서는 활성을 크게 잃는다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 63, 4, 136, 주체106(2017).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 6, 110, 주체105(2016).
- [3] 김철호 등; 생물학, 3, 12, 주체104(2015).
- [4] 김철호 등; 생물학, 3, 7, 주체105(2016).
- [5] D. E. C. S. Rao et al.; Journal of Applied Microbiology, 105, 1128, 2008.
- [6] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1~300, 2001.
- [7] T. T. Thi et al.; J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37, 279, 2010.
- [8] Wei Xu et al.; Appl. Biochem. Biotechnol., 175, 3184, 2015.

Purification and Several Enzymatic Characterization of Recombinant Phytase of *Bacillus subtilis*

Kim Chol Ho, Kim Ju Song

We purified recombinant phytase from recombinant expression product of phytase gene cloned from the genome of *Bacillus subtilis* A1731 and characterized it. Purified protein displayed single band on SDS-PAGE, and its molecular weight was about 41kD.

The optimum pH of phytase is 7.0, and it is relatively stable from pH 4.0 to 8.0. The optimum temperature is 65°C when the reaction time is 15 minutes. The enzyme activity is partially inhibited by Cr^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , and completely inhibited by Cd^{2+} .

The phytase is stable at pancreatin hydrolysis but it significantly loses its activity by pepsin hydrolysis.

Key words: *Bacillus subtilis*, phytase, enzymatic characterization, pancreatin, pepsin