

Purification of a Thermostable Recombinant *Sulfolobus solfataricus* Esterase Expressed in a Mesophilic Host

김성훈^{1,3}, 이선복^{1,2,3}

포항공과대학 환경공학부¹, 화학공학과², 분자생명과학부³

TEL (0562) 279 - 2268 FAX (0562) 279 - 2699

Abstract

The purification of a thermostable esterase expressed in *Escherichia coli* was investigated using thermoprecipitation of unclarified cell homogenates followed by after applying the heat-treated lysate to phenyl-sepharose column, and elution with detergent. Heat treatment at 70°C was capable of removing to *E. coli* proteins. Specially, the thermoprecipitation with 15% polyethylene glycol 8000 can remove host proteins and nucleic acids efficiently. Various detergents were used to recover the esterase, which was strongly bound to phenyl-sepharose resin. Triton X-100, non-ionic detergent, was found to be the most efficient of all tested detergents.

서론

고온에서 뿐 아니라 유기용매, 계면 활성제, 효소 변성제 등에 높은 안정성을 지닌 내열성 효소는 산업적 유용성으로 인해 많은 연구가 이루어지고 있다.¹⁾ 내열성 효소의 극한 환경에 대한 안정성은 고온, 고압 및 유기 용매 등의 극한 조건에서의 생물촉매 반응에 유용할 뿐 아니라 일반적인 중온성 효소에 비해 이중 숙주에서 대량 발현 후 분리가 용이하다는 장점을 가지고 있다.²⁾ 그러나, 중온성 숙주에서 발현된 내열성 효소의 분리를 위해서는 발현된 효소의 활성에 영향을 미치지 않고 숙주의 단백질을 최대한 제거할 수 있는 thermoprecipitation의 최적 온도를 찾는 것이 중요하다. 특히 hydrophobic한 내열성 효소의 경우는 hydrophobic column의 강한 affinity로 인하여 분리하기가 어렵다. 또한, 소량의 단백질 정제에서는 문제가 되지 않지만 다량의 단백질을 정제하는 경우 숙주의 DNA는 crude extract의 viscosity를 증가시키는 원인이 되기 때문에 이를 제거하는 것이 필요하다.³⁾

따라서, 본 실험에서는 70°C 이상에서 성장하는 *Sulfolobus solfataricus*의 esterase를 이중 숙주인 *E. coli*에서 발현시켜 내열성, 유기용매, 계면 활성제의 내성을 이용해 최적 분리하는 방법을 연구하였으며 또한 polyethylene glycol(PEG)을 이용하여 단백질의 대량 정제시 viscosity에 영향을 주는 DNA의 제거를 시도하였다.

재료 및 방법

1. Esterase cloning 및 균주 배양

초고온성 미생물, *Sulfolobus solfataricus* DSM1617의 chromosome DNA에서 PCR을 이용하여 putative esterase coding 하고 있는 fragment를 증폭하고 이를 expression vector인

pREST(Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning하고 *E. coli* BL21(DE3)에 transformation시켜 EST030 strain을 제작하였다. EST030 strain을 37°C, LB medium에서 14 시간 배양하여 균체를 회수하였다.

2. Thermoprecipitation 및 효소 반응

회수된 균체에 20mM Tris · HCl (pH 8.0)을 넣고 5 분간 sonication 하여 crude extract를 제조한 뒤 이를 40°C-90°C 범위의 온도에서 30 분간 thermoprecipitation을 하였다. 열처리가 끝난 crude extract는 cooling을 한 후에 *p*-nitrophenol caprylate(pNPC)을 substrate로 사용하여 효소의 활성을 조사하였다. 반응 buffer로는 20mM Tris · HCl (pH 8.0)에 0.4%(w/v) Triton X-100과 0.1%(w/v) arabic gum을 넣어 substrate : buffer = 1 : 9의 비율로 하여 사용하였다. 효소 반응은 37°C에서 시켰으며, 효소의 1 Unit은 1분당 pNPC에서 유리되는 *p*-nitrophenol의 μ mol로 정의하였다.

3. Polyethylene glycol(PEG) 및 detergent의 처리

Thermoprecipitation 후의 crude extract를 ammonium sulfate로 1M이 되도록 equilibrium을 시킨 뒤 이를 phenyl-sepharose column(Amersham-Pharmacia, Sweden)과 4°C에서 30분간시킨 후 1M의 Triton X-100, Tween 20, sodium cholate, octylglucoside가 포함된 20mM Tris · HCl (pH 8.0)을 5분간 처리한 후 이를 4°C에서 원심 분리하여 상등액을 취하여 효소 반응과 단백질 정량을 하였다. 30% ethanol과 0.5M NaCl이 들어있는 test tube에 crude extract를 넣고 PEG 8000을 0-30%로 변화시키면서 OD₂₆₀에서 DNA precipitation을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. Thermoprecipitation의 최적 온도 결정 및 효소 활성에 대한 고찰

열에 안정한 내열성 효소의 특성을 이용하여 *E. coli*에서 발현된 *S. solfataricus* DSM1617 esterase의 분리를 조사하였다. 40°C-90°C 범위에서 30분간의 thermoprecipitation 후 단백질의 양과 esterase의 activity를 plot을 한 결과 40°C-70°C까지는 thermoprecipitation에 의해서 *E. coli*의 단백질이 현저하게 감소되었지만 70°C 이상에서는 감소의 폭이 둔화되었다.

한편, 효소의 활성은 70°C까지 esterase activity가 유지되었지만 80°C부터 activity가 감소하기 시작했다. Specific activity는 70°C에서 2,265 U/mg으로 최대로 나타났다 (Figure 1). SDS-PAGE에 각 시간별 sample을 loading 한 결과 약 34KDa의 단백질 band가 40°C-90°C의 범위에서 뚜렷하게 나타났으며 *E. coli* 단백질은 점차 감소하는 경향을 보여 주었다 (Figure 2).

비록 thermoprecipitation으로 4배의 순도밖에 향상시키지 못했지만 전체적인 *E. coli* 단백질에 비해 발현되는 esterase의 양이 적기 때문에, specific activity 결과로 보았을 때 상당히 많은 양의 esterase가 열처리 후의 crude extract에 포함 되어있다고 할 수 있다.

2. Hydrophobic interaction column의 elution 효율에 대한 고찰

여러 가지 특성을 갖는 column을 이용하여 esterase를 분리하는 시도하였다. Hydrophobic interaction column인 phenyl-sepharose column에서 *S. solfataricus* DSM1617 esterase가 강한 affinity를 갖는 것을 발견하고 이를 다양한 detergent로 elution시켜 효율을 조사하였다. 비이온성

계열인 Triton X-100, Tween 20과 음이온 계열인 sodium cholate, octylglucoside을 사용하여 phenyl-sepharose column에서 elution 되는 단백질의 양을 조사한 결과 모든 detergent가 80% 이상의 elution 효율을 보여주었다 (Figure 3). 그러나, 음이온 계열인 octylglucoside와 sodium cholate에서는 효소의 활성이 없어지거나 저해되었지만 비이온성 계열인 Triton X-100과 Tween 20에서는 활성이 초기와 같은 상태로 유지되었다. 특히 Triton X-100의 경우는 최대의 activity를 나타내었으며 column을 통과하면서 esterase가 농축되어 최종 elution 되는 fraction에서의 specific activity는 3,968 U/mg으로 높게 나타났다 (Figure 4).

3. DNA 제거를 위한 PEG 8000에 대한 고찰

Pilot scale 이상에서 숙주의 DNA는 crude extract의 점성을 증가시키는 요인으로 단백질 분리 시 영향을 준다. 본 연구에서는 내열성 효소의 유기용매에 대한 내성과 DNA가 salt와 PEG에 대한 precipitation을 이용하여 내열성 효소의 pilot scale에서 DNA 제거를 조사하였다. 0.5M NaCl, 30% ethanol 함량시 PEG 8000을 0-30%로 변화시키면서 DNA의 감소를 측정한 결과 PEG 8000의 함량이 15%일 때 전체 DNA가 1/3로 줄어드는 것을 관찰했으며 효소의 활성은 변화 없이 일정하게 유지되었다 (Figure 5). PEG 8000의 함량이 20% 이상이 되기 시작하면 PEG 8000 자체의 점성이 증가하기 때문에 DNA 제거 효율은 떨어지기 시작했으며, 또한 PEG 8000으로 인하여 단백질의 precipitation이 일어났다 (Figure 6). 이것은 PEG 8000의 농도가 25-30%일 때 단백질이 precipitation 된다는 K. Ingham의 보고와 일치하였다.⁴⁾

참고문헌

1. Kristjansson, J. K. Thermophilic organisms as source of thermostable enzymes (1989). Trends Biotechnol. 7: 349-353.
2. Skamoto, Y., Nakajima, H., Nagata, K., Esaki, N. and Soda, K. Large-scale production of thermostable alanine dehydrogenase from recombinant cells (1994). J. Fement. Bioeng. 78: 84-87.
3. Kirk, N. and Cowan, D. Optimising the recovery of recombinant thermostable proteins expressed in mesophilic hosts (1995). J. Biotechnol. 42: 177-184.
4. Ingham, K. C. Precipitation of proteins with polyethylene glycol (1990). Methods Enzymol. 182: 301-306

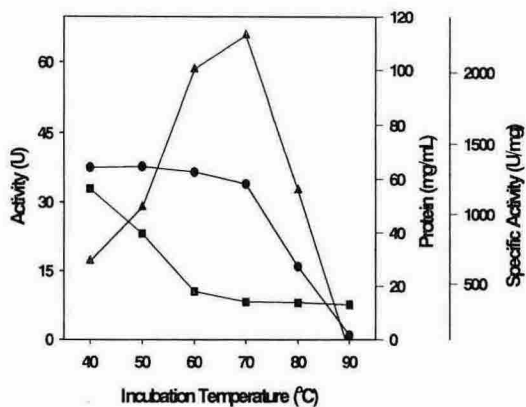


Figure 1. Heat-induced changes in protein(■), esterase activity(●), and specific activity(▲) in *E. coli* cell homogenates.

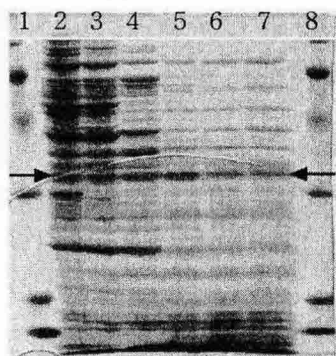


Figure 2. SDS-PAGE of *E. coli* cell homogenates after thermoprecipitation at various incubation temperatures. lane 1, and lane 8, size marker; lane 2, 40°C; lane 3, 50°C; lane 4, 60°C; lane 5, 70°C; lane 6, 80°C; lane 7, 90°C

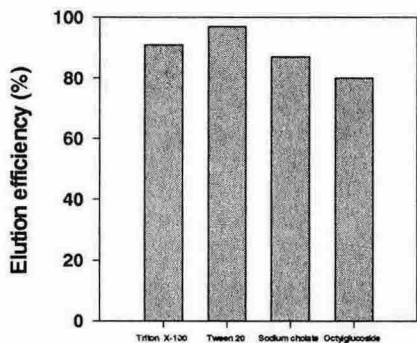


Figure 3. Effect of various detergents on efficiency of esterase elution from phenyl-sepharose column.

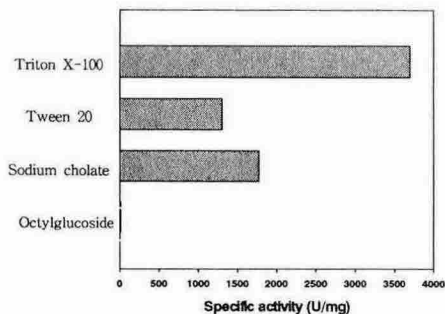


Figure 4. Specific activity of esterase after detergent treatment in phenyl-sepharose column.

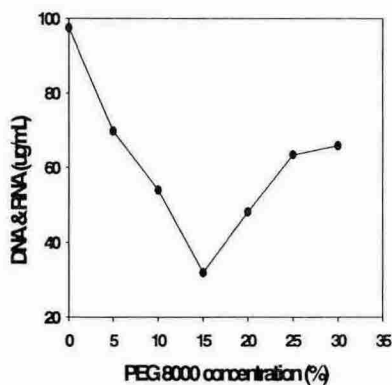


Figure 5. Removal of DNA and RNA at various concentrations of PEG 8000 in the presence of 0.5M NaCl and 30% ethanol.

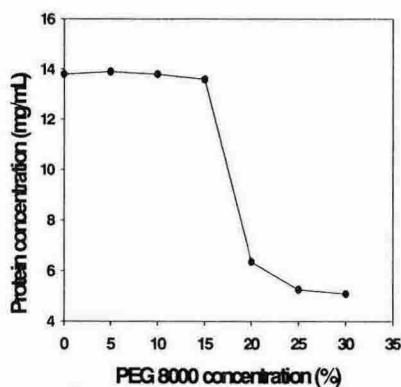


Figure 6. Effect of PEG 8000 concentration on protein recovery in the presence of 0.5M NaCl and 30% ethanol.