

Thermostable Enzymes: Massive Expression and Application

신현재*, 이대실

대전광역시 유성구 어은동 52, 한국생명공학연구원 바이오벤처센터 309호 (주) 엔지뱅크

서론

자연계에 존재하는 미생물 가운데 55°C 이상의 고온에서 생육 가능한 고온성 미생물이 보유한 내열성 효소는 열적으로 매우 안정하며, 유기용매, 계면활성제, 기타 외부 환경변화에 대해서도 높은 안정성을 보유하고 있어 그 산업적 응용에 대한 연구가 무척 활발하다. 이러한 고온성 미생물 중 에서 몇몇 DNA polymerase, amylase, lipase 등은 이미 산업적으로 이용되고 있는 실정이다. 내열성 효소는 화학산업, 제지 및 펄프, 식품 및 사료, 섬유 및 피혁, 금속 및 광산, 에너지 산업 등에 매우 폭넓게 활용되므로, 21세기 생물공학분야의 큰 축을 이루게 될 것으로 판단되고 있다. 이러한 미생물 유래 효소의 연구/개발은 최근 비약적인 기술발전을 이루고 있는 게놈분석기술의 도움을 받아 그 발전속도가 비약적으로 증가하고 있다. 현재 국내에서 게놈 염기서열 전체가 해독된 것은 모두 미생물로서 현재 5종 정도이다. 바이오벤처 기업인 마크로젠이 지난해 알콜발효 균주인 *Zymomonas mobilis*의 전체 염기서열을 분석한 이래 *Helicobacter pylori*, *Manhemier 55E*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Symbiobacter toebil*의 게놈 염기서열이 모두 바이오 벤처기업에 의해 해독됐다. 한편, 당사와 생명공학연구원 당생물학실에서는 수 년 전부터 초고온성 미생물인 *Thermus caldophilus* GK24의 게놈분석과 효소 스크리닝 연구를 진행 중이며, 현재 20여종의 효소가 시약용/산업용으로 개발 완료된 상태이며, 200여종 이상의 효소가 대량 발현 단계에 있다. 본 보고에서는 내열성 효소연구와 관련된 미생물 관련 유전자 데이터베이스 구축 및 유전자 확보, 대량 발현, 효소 생산 및 그 응용에 관한 전체적인 진행결과를 설명하고자 한다.

1. 미생물관련 유전자 데이터베이스 구축 및 ORF 자동 검색 프로그램 개발

본 연구에서는 *Thermus caldophilus* GK24 (~2 Mkb) 염기서열 중 약 20%인 400 kb를 이용하여 단편적인 염기서열의 통합화와 여기에서 파생된 contig로부터 기능성 단백질 유전자를 찾아내는 작업을 수행하였다. ABI 시리즈 DNA 서열분석기로부터 얻어진 DNA서열 단편을 모아 일반적인 유전자 어셈블리 프로그램인 PHRED, PHRAP, GAP4, CAP3, TIGR assembler, Lucy, CrossMatch, CONSED, Seqman (LASERGENE), Assemble (Vector NTI)등을 이용하여 보다 큰 약 35 kb 염기서열 10개를 얻었다. 이러한 프로그램의 내부 알고리즘의 핵심은 염기서열 정렬 알고리즘에 기반을 두고 있다. 단편적인 염기 서열들 간의 상호 연관성을 기반으로 중첩되는 부위의 염기서열 정렬에 의하여 하나의 긴 염기 서열들을 만들어 낸다. DNA서열에 기능을 부여하는 작업은 이미 알려진 정보와 데이터들을 효율적이고 상호 호환이 될 수 있는 형태로 잘 정리하여 새로운 형태의 정보를 창출 해 내는 것이기 때문에 우선적으로 DB의 확립이 중요하다. 그러므로 본 연구에서는 인터넷상에 공개된 GENBANK, SWISSPROT, TREMBL, PIR, OWL, PDB 와 같은 외국의 신뢰할 수 있는 데이터들로부터 최신의 염기 서열 정보를 수집하여 자체적으로 미생물에 관한 다량의 아미노산 서열 데이터베이스를 구축하였다. 또한 다량의 아미노산 서열 데이터 자체가 annotation 에러, sequencing 에러, reading frame 에러, 재정렬 에러, contaminants 등 많은 문제점을 내포하고 있다. 염기 또는 단백질 서열과의 비교 검색 시 이러한 여러 가지 문제점을 보완할 수 있는 방법이 필요하기 때문에 이차 데이터베이스인 PRINTS, PROSITE, TIGRFAM, PFAM, BLOCKS, DOMO, PRODOM을 입수하여 motif-based 데이터베이

스를 구축하였다. 관계형 데이터베이스를 기본 축으로 구현하였으며 7개의 테이블로 이루어져 있다. 테이블들은 서로간에 참조하기 쉽게 연결되어 있어 하위 및 상위 데이터간에 일관성 있는 관계를 유지하도록 하였다. 이러한 데이터베이스는 분석프로그램들과 효율적으로 연동 할 수 있도록 내부 인터페이스를 갖추고 있다. 또한 점차 방대해지는 데이터를 처리하기 위하여 데이터베이스 내에 각각의 단백질 서열들에 대한 상세한 정보를 참조한 후, 필요하면 부가적인 실험 정보 (아미노산 조성, 서열 정보 등)를 첨가할 수 있도록 구성하였다. 미생물 계놈에 관한 전체 전산분석의 시스템의 구성은 크게 다섯 부분으로 이루어진다. 첫째 자동 염기서열결정기로부터 나온 가공되지 않은 단편적인 염기 서열 데이터에서부터 가급적 긴 contig를 가공하는 부분, 둘째 각종 데이터들을 체계적으로 집적하고 관리하기 위한 데이터베이스부분, 셋째 염기서열 데이터를 대상으로 ORF (Open Reading Frame)를 임의적으로 정하는 부분, 실제 분석을 행하는 분석프로그램 부분, 마지막으로 결과해석을 사용자가 직접 할 수 있도록 간략히 정리해주는 부분으로 이루어져 있다. 이 시스템을 이용한 ORF를 추정하는 프로그램은 리눅스 및 윈도우즈 운영 환경에서 사용이 가능하도록 코딩되었으며 이들 제품은 (주)엔지뱅크에 의해 상용화되어 판매중에 있다.

2. 대량발현

유전자분석을 통해 얻어진 자료를 바탕으로 PCR을 수행하고 규격화된 host-vector system을 이용하여 대량발현을 수행하였다. 발현양상은 SDS-PAGE 결과를 1차 대상으로 삼고 실질적인 활성확인 은 2차로 실시하였다. 내열성 효소의 특성상 열처리된 효소액을 이용하여 1차 선택의 확률을 높일 수 있었다. 아래 표에 본 과정을 통해 확보된 결과 중 일부를 나타내었다.

표 1. 대량발현을 통해 확보된 내열성 탄수화물 유전자 및 클론 일부

효소명칭	발현벡터/대장균 호스트
<탄수화물 생합성효소>	
UDP-sugar pyrophosphorylase	pKK223-3/MV1184
TDP-glucose pyrophosphorylase	pKK223-3/MV1184
UDP-galactose pyrophosphorylase	pJR18/MV1184
polysaccharide. synthase	pKK223-3/MV1184
Lyt B protein	pJR18/MV1184
<탄수화물 대사효소>	
trehalose-6-P-phosphatase	pET22B(+)/BL21
fructose-6-P-amidotransferase	pJR18.MV1184
<탄수화물 전환효소>	
trehalose synthase	pTrc99A/MV1184
xylose isomerase	pKK223-3/MV1184
amylomaltase	pKK223-3/MV1184

<탄수화물 가수분해효소>

α -glucosidase	pKK223-3/MV1184
α -galactosidase	pJR18/MV1184
β -1,4-endo-glucanase (endo-cellulase)	pKK223-3.MV1184
β -glucosidase (exo-cellulase)	pKK223-3/MV1184

3. 효소 분리정제

1) 탄수화물 관련효소

가) Amylomaltase

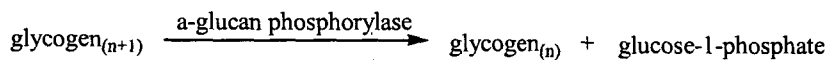
Amylomaltase는 미생물의 맥아당 대사에 필수적인 효소로써, 이 효소는 맥아당 혹은 말토덱스트린을 가수분해하여 포도당과 잔류 덱스트린을 형성하며 이때 생성된 포도당은 인접덱스트린에 전이된다. 이러한 분자간 당전이 활성은 실용적인 목적에 사용될 수 있다. 소규모 특수 연구시약으로 사용되는 G3-G7류의 고순도 정제 제품이 사용되고 있다. 또한 혼합물 형태의 올리고당은 낮은 감미도와 높은 점도, 결정석출 방지능, 우수한 내열성 및 보습성, 높은 피막 형성능 등으로 식품, 화학 분야에 첨가제로 널리 사용될 수 있다.

나) β -glucosidase

β -glucosidase는 섬유소인 cellulose를 분해하는 효소의 일종으로 endo- 및 exo-glucanase에 의해 분해생성된 cellobiose를 glucose로 만들어 주며, alkyl-또는 aryl-glucoside를 분해한다. 당사에서는 본 효소를 이용하여 배당체를 합성하였으며, 천연물에 존재하는 배당체의 당쇄구조를 선택적으로 절단하여 중간대사 산물을 대량으로 생산하는데 성공하였다.

다) α -glucan phosphorylase (E.C. 2.4.1.1)

α -glucan phosphorylase는 polysacchride를 glucose-1-phosphate로 가역 전환 반응시키는 효소로서 storage glycogen이나 starch를 세포안에서 분해시키는 첫 번째 단계에 역할을 하는 효소이다.



라) Xylose isomerase [EC 5.3.1.5]

Xylose isomerase는 식품산업체에서 high-fructose corn syrup (HFCS)를 생산하는데 널리 사용된다. 한편 xylose isomerase는 lignocellulosic한 biomass의 주요 성분으로 bacteria, yeast, fungi 등에 의해 발효될 수 있다. 당사 보유 효소의 전환율은 55%로서 현재 효소를 이용한 대량 발효가 진행중이다 (대장균 내에서 발현양상은 아래 그림 참조).

2) 기타 효소

가) Alanine dehydrogenase [EC 1.4.1.4]

Alanine dehydrogenase는 carbohydrate와 amino acid의 metabolism을 연결시켜주는 역할과, 다양한 생물체의 탄소원과 질소원의 대사과정에서 중요한 역할을 한다. 생산된 효소의 활성은 열처리한 시료의 경우 1440.3 U/mg protein 였으며, DEAE 칼럼을 통과한 시료의 경우 14594.5 U/mg protein 이었다. 분자량은 41,000 Da, 최적 pH는 8, 온도는 60°C 였으며, pH 안정성은 7-8, 온도안정성은 70°C 이하였다.

나) Aminopeptidase

aminopeptidase는 N-terminal 의 peptides 나 proteins를 잘라내는 것을 촉진하는 효소이며 (다음 그림 참조), prokaryotic 이나 eukaryotic에 널리 분포되어 있는 효소이다. 분자량은 45,000 Da, 최적 pH는 8, 온도는 90°C 였으며, pH 안정성은 8-9, 온도안정성은 75°C 이하였다.

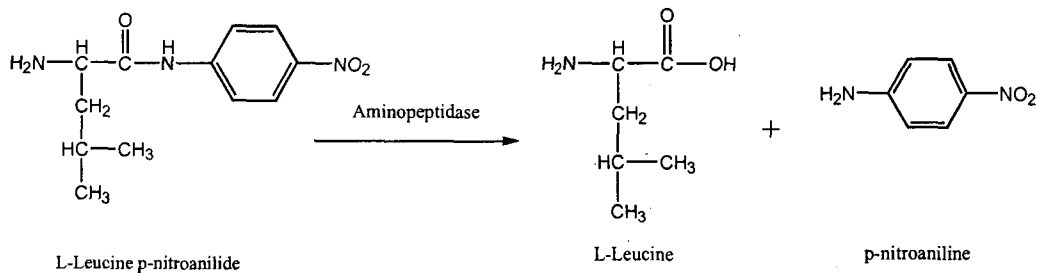


그림 1. Aminopeptidase의 반응 모식도

4. 효소대량생산을 위한 유가식배양

Thermus 유래의 gene을 유가식배양을 통해 *E. coli*에서 over-expression을 시킨 보고는 드물다. 목적 단백질을 대량생산하기 위해서는 우선적으로 host-vector interaction을 고려해야만 한다. 목적단백질을 함유하고 있는 vector와 궁합이 맞는 host를 선택하는 작업은 case-by-case로 여러 host에 형질전환을 시킨 후 발현양상을 비교하여 선별하게 된다. 선별된 host를 이용하여 대량생산을 하기 위해서는 유가식 발효공정의 도입은 필수적이다. 유가식 배양의 C-source로는 glycerol과 glucose를 많이 사용하는데 glycerol은 가격이 비싸며, 세포성장속도가 느려 배양시간이 길어지는 단점을 가지고 있어, 통상적으로 glucose를 많이 사용한다. Limiting substrate로서 glucose를 사용하는 경우 catabolite repression의 영향이 미치지 않는 농도로 포도당의 농도를 유지하는 배지공급전략을 짜는 것이 관건이다. 각 host마다 repression을 받는 농도는 저마다 다르므로 세포의 대사상태를 잘 파악해야 한다. 배지공급전략은 세포의 대사상태가 pre-induction phase와 post-induction phase가 다르며 각 phase별로 세포성장속도가 생산성에 영향을 미친

다. 단백질 유도시기는 대사상태가 세포성장시기와는 다르므로 세포성장속도를 달리하는 전략이 유효할 것으로 생각된다. pre-induction phase에서는 본 연구에서는 선별작업을 통해 MV1184 (pkk233/ tac-promoter) system을 이용하여 feed-forward exponential feeding 방법을 이용하여 pre-induction phase에서는 $\mu=0.18$ 로 했으며, post-induction phase에서는 $\mu=0.15$ 로 변화를 주어 배지공급을 실시 했다.

DCW 50 g/L를 목표로 모든 조건을 설정하였고, 접종 후 포도당이 고갈된 후부터 배지공급을 시작하였다. 최종적으로 OD는 80(ca. DCW 35g/L)이었다. 대부분 *E. coli* system에서 문제가 되는 것은 대량발현 유도시 inclusion body를 형성인데, 본 system의 경우는 soluble form으로 발현이 되었고 활성도 뛰어났다. 발현량도 batch culture를 통해 생산된 양의 20배 이상이 되었다.

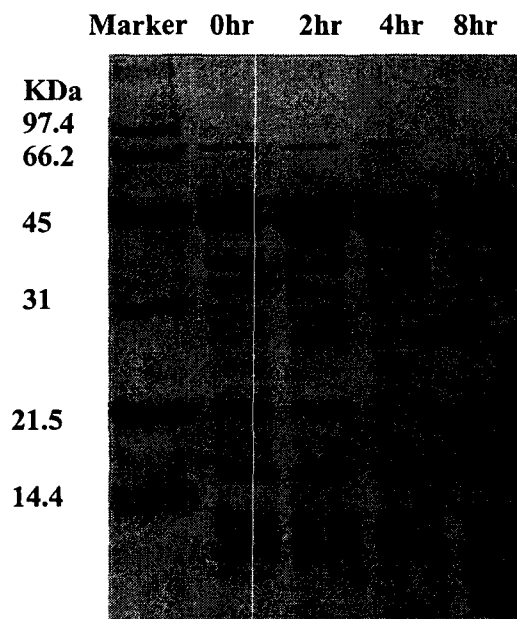


Figure 2. SDS-PAGE gel of xylose isomerase after induction

5. 내열성 효소의 응용

1) 효소를 이용한 고순도 트레할로스의 대량생산

트레할로스는 동일 농도의 설탕에 비해 반에 해당하는 당미를 가진 감미료로서 뿐만 아니라 기초과학, 의학, 농학 그리고 생전자학 (bio-electronics) 등의 분야에서 biomolecules의 안정화 효과에 대한 다양한 응용성을 가지고 있다. 따라서 트레할로스는 건조 또는 냉동 식품에 있어 안정제로 그리고 진단 시약들과 제약의 첨가제로 의약품에 사용될 수 있으며 효소를 포함한 생리활성 단백질의 열응집과 열변성을 방지하는 안정제 및 화장품에 있어 보습제로서 다양한 분야에 매우 유용하다. 본 연구의 목적은 의약용으로 사용 가능한 98%이상의 고순도의 trehalose 생산하는 것이다. 당사의 기술은 맥아당 기질로부터 trehalose synthase를 사용하여 트레할로스를 one-step으로 제조한다. 생산에 사용되는 효소는 현재 배지의 최적 조건과

IPTG 조건을 완성하고 있으며, 배지로는 일반적으로 사용하고 있는 LB medium, glycerol이 포함된 minimal medium과 GYM medium을 사용하였다.

2) 효소를 이용한 alkyl glycoside의 합성

클루코사이드는 비온성 계면활성제군으로서 염기조건에서 무척 안정하고 항균활성 및 생분해성을 나타내며 세제, 식품, 의약 및 화장품 산업에 광범위한 응용성을 가진다. 본 연구는 위와 같은 용도를 대상으로 하는 glycoside를 대량으로 생산하는 것을 그 목적으로 한다. beta-methyl glucoside를 합성하기 위하여 methanol과 증류수의 비율이 20%v/v를 solvent로 하여 glucose와 solvent의 비율이 10%w/v로 하였다. 효소는 beta-glucosidase를 이용하였으며 1M NaOAc pH5.0를 solvent의 10%v/v를 넣어주어 70℃ 항온조에 2일간 반응 시켰다. 기질의 20%의 수율을 얻을 수 있었다. beta-2-propanoyl glucoside 합성의 경우는, 증류수와 2-propanol의 비율을 10%v/v로한 solvent에 Glucose를 solvent의 3.6%w/v로 넣고 beta-glucosidase를 넣어 70℃ incubator에 넣어 2일간 반응시킨 후 수율을 계산하였다. 이를 Thin layer chromatography를 이용하여 분리하였으며, 위의 것들을 200Mhz NMR을 이용하여 구조분석을 하였다.

3) β -glucosidase를 이용한 진세노사이드-알디의 대량 제조

자연계에 존재하는 수많은 식물에는 의약품의 재료로서 사용할 수 있는 생리활성을 지닌 매우 다양한 형태의 복합탄수화물이 존재하고 있다. 특히 고려 인삼에 존재하는 사포닌인 ginsenosides는 순환기 및 중추신경 치료제, 항산화, 항암, 당뇨병, 면역기능 조절 등의 약효를 이용한 제약으로 개발이 가능하여 많은 기업들이 상업화에 박차를 가하고 있는 상황이다. 특히 ginsenoside Rd [20(S)-protopanaxadiol-3-O- β -di-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -di-glucopyranoside]는 protopanaxadiol에 속하는 tri-glucoginsenoside로서 동맥경화 억제 작용, 부신피질 호르몬 분비 촉진작용, 소뇌성장 회복작용, 코스코스테롤 분비 촉진작용 등을 갖는 생리활성 물질로서 최근 관심이 집중되고 있다. 본 연구를 통하여 호열성 균주로부터 유래한 β -glucosidase를 인삼에서 추출한 Rb₁, Rb₂, Rc와 반응시켜 95% 이상의 전환율로서 Rd를 얻었으며, 이를 분리, 정제하여 순수한 Rd 제품을 확보한 후 이를 이용해 좀더 발전적인 유사 화합물의 합성에 이용하였다. 효소반응 공정 이외에 인삼파우더에서 사포닌을 분리하는 공정을 확립하였으며, 생산된 Rd를 효율적으로 분리,정제하기 위한 공정을 확립하였다. 향후에는 Rd 이외의 수많은 배당체 가운데 약리활성이 확인된 화합물을 본사가 보유한 enzyme library를 이용하여 구조전환을 할수 있는 기술의 확립 및 나아가 모든 배당체를 효소를 이용하여 당쇄구조를 조절하는 기술을 확립하는 것이다.

6. 결론 및 제언

미생물을 이용한 신규 산업용 기능성 소재의 개발은 기존 산업으로의 파급효과가 클 뿐만 아니라 신규 산업창출도 가능한 21세기 생물공학의 핵심기술로서 그 역할이 매우 중요시되고 있다. 특히 본 보고서에서 언급된 효소개발/생산 연구분야는 국내 연구수준이 세계와 경쟁할만한 몇몇 분야중의 하나로서 산학연의 협력연구가 절실히 요구된다. 끝으로 (주)엔지뱅크는 국내 효소산업의 경쟁력 제고를 위해 국내 효소 연구자들의 연구성과를 효율적으로 관리/공유할 수 있는 시스템 구축을 제안하고자 한다.

참고문헌

- Anisur Rahman khan *et al.* "Characterization of a solvent resistant and thermostable aminopeptidase from the hyperthermophilic bacterium, *Aquifex aeolicus*" *Enzyme Microbial Technol.*, 27, 83-88 (2000)
- Asim Esen, β -glucosidase: biochemistry and molecular biology, ACS symposium series, 533 (1993)
- Birgit Boeck, Reinhard Schinzel "Purification and characterisation of an α -glucan phosphorylase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*" *Eur. J. Biochem.*, 239, 150~155 (1996)
- Chang C. Song HK. Park BC. Lee DS, Suh SW "A thermostable xylose isomerase from *Thermus caldophilus* : biochemical characterization and preliminary X-ray analysis" *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55(Pt 1): 294-6 (1999)
- Coughlan M. P. "Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview" *Biores. Technol.*, 39, 107~115 (1992)
- Shin, H.-J., Shin Y. and Lee, D.S. "Formation of α -E-glucose-1-phosphate by thermophilic α -1,4-D-glucan phosphorylase" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 89~93 (2000)
- Kim, J.S., Koh, S., Shin, H.-J., Lee, D.-S. and Lee, S.Y. "Biochemical characterization of a UDP-sugar pyrophosphorylase from *Thermus caldophilus* GK24" *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 11-17 (1999)
- Koh, S., Shin, H.-J., Kim, J.S., Lee, D.-S. and Lee, S.Y. "Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*" *Biotech. Lett.*, 20, 757-761 (1998)
- Shin, H.-J., Kim, M., Lee, D.-S., Purification and characterization of N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase from *Thermus caldophilus*, *J. Biosci. Bioeng.*, 88, 319-322 (1999)
- Yoshinobu Terada, Kazutoshi Fujii, Takeshi Takaha and Shigetaka Okada "*Thermus aquaticus* ATCC33923 amyloamylase gene cloning and expression and enzyme characterization : production of cycloamylose" *Appl. Environ. Microbiol.*, Mar. 910-915 (1999)