

In vitro coevolution에 의한 저온/고온 융합형
산화환원효소 개발(1차년도)

Development of psychrophilic and thermophilic fusion
oxidoreductase by in vitro coevolution (1st)



동의대학교 산학협력단

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴”과제의 위탁 연구“In vitro coevolution에 의한 저온/고온 융합형 산화환원효소 개발(1차년도)”과제의 최종보고서로 제출합니다.



2016. 1. 22.

총괄연구책임자 : 박 현

위탁연구기관명 : 동의대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 전 승 종

위탁참여연구원 : 문 수 정

위탁참여연구원 : 최 혜 주

위탁참여연구원 : 정 성 환

위탁참여연구원 : 왕 지 연

위탁참여연구원 : 차 승 현

요 약 문

I. 제 목

In vitro coevolution에 의한 저온/고온 융합형 산화환원효소 개발

II. 연구개발의 필요성 및 목적

1. 필요성

저온, 중온, 고온균 유래의 효소들은 통상 각각 저온, 중온, 고온 하에서 효율적인 촉매 반응을 수행한다. 자연적으로 진화된 상동성 효소 또는 인공적으로 가공된 효소들의 비교 연구를 보면 대부분 효소들은 안정성에 요구되는 구조적 견고함과 활성에 필요한 구조적 유연성 중에서 어느 한쪽을 유지하는 것으로 보여 진다. 그럼에도 불구하고 분자진화 및 점 돌연변이를 통하여 몇몇 효소 변이체는 높은 활성과 높은 안정성을 동시에 소유할 수 있다. 효소의 산업화를 위해서는 공통적으로 효소 내열성이 요구된다. 반면, 저온에서 효소의 높은 촉매 활성은 에너지 절약 차원에서 경제적이고 환경적인 이점을 제공한다. 효소의 산업화를 위해 높은 상동성을 가지는 저온 및 고온성 산화환원효소(laccase, glucose dehydrogenase)들은 다른 온도에서 적응하는 효소의 구조적 안정성과 활성과의 관계를 이해하는데 도움을 줄 수 있다. 본 연구에서는 효소 활성과 안정성에 중요한 구조적 메커니즘을 규명하기 위하여 in vitro evolution을 통하여 저온 및 고온 융합형 산화환원효소의 특성에 대하여 연구하였다.

2. 목적

생명정보학적, 합성생물공학적 기법을 이용하여 저온 및 고온 단백질의 융합화 전략을 구체화하고 이를 바탕으로 산업적 생물전환/소재개발에 부합하는 단백질 고활성화 및 안정화 획득 방식을 개발하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

저온균(*Planococcus donghensis*) 및 고온균(*Thermus thermophilus HJ6*) 유래 산화환원효소의 유전자 클로닝과 대장균에서의 효소 생산을 수행하고 laccase의 생화학적 특성을 연구한다.

IV. 연구개발결과

저온균(*Planococcus donghensis*) 및 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6)로부터 laccase와 glucose dehydrogenase 유전자는 클로닝하였고 대장균 세포에서 발현 되었다. 고온균 유래 laccase는 대장균에서 불용성 과립을 형성하였다. 불용성 과립은 6M 염산구아니딘을 사용하여 가용화하였고 Ni-chelation 컬럼 안에서 재접힘(refolding)과 gel filtration을 통하여 정제하였다. UV-Vis과 EPR spectrum 분석에서 정제된 효소는 type I Cu(II)과 type III binuclear Cu(II) 형태의 구리원자를 포함하는 것으로 확인 되었다. 재조합 laccase는 최적온도 75℃를 나타내었고, ABTS와 syringaldazine에 대한 최적 pH는 각각 4.5와 6.0 이었다. 활성의 반감기는 85℃에서 50분으로 확인되어 높은 내열성을 가지는 것으로 확인되었다. 본 효소의 활성은 sodium azide, L-cystein, EDTA, dithiothreitol, tropolone 및 kojic acid에 의해 강하게 저해되었다. Kinetic 분석에서 본 효소는 syringaldazine에 대해 가장 높은 기질 친화도를 나타내었고, guaiacol에 대해서는 가장 높은 촉매상수(kcat)을 보였으며, 촉매 효율(kcat/Km)은 2,6-dimethoxy-phenol이 가장 높은 것으로 나타났다. 저온성과 고온성 laccase는 활성에 대한 최적온도에 상당한 차이를 보임에도 불구하고 구조적으로 높은 상동성을 나타내었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

In vitro coevolution을 통하여 산화환원효소의 고활성화 및 안정화에 대한 조절 기반기술이 확보되면 산업적으로 다양한 화합물의 환경 친화적 및 경제적 생산이 가능하게 된다. 특히, Laccase의 고활성화는 염료탈색, 펄프표백, 폴리머 합성, 바이오센서, 바이오연료전지, 환경정화 등에 활용하여 높은 경제적 수익을 창출할 수 있다.

Summary

I. Title

Development of psychrophilic and thermophilic fusion oxidoreductase by in vitro coevolution

II. Necessity and objective

Enzymes from psychrophiles, mesophiles, and thermophiles usually perform efficient catalysis under low, moderate and high temperatures, respectively. Comparing studies of either naturally evolved homologous enzymes or artificially engineered enzymes have demonstrated that there is a trade-off between the rigidity required for stability and the flexibility necessary for activity in most enzymes. Nevertheless, some variant enzymes coupling high activity and high stability have been engineered by directed evolution or site-directed mutagenesis. Thermostability is one of the main requirements for commercial enzymes, because thermal inactivation represents a common problem in the application of enzyme. Meanwhile, enzymes with high catalytic activity at low temperatures offer economic and environmental benefits through energy savings.

The psychrophilic and thermophilic laccases share high identities (27~37%), as well as psychrophilic and thermophilic glucose dehydrogenase, providing us an opportunity to improve our understanding of structure stability-activity relationship in enzymes adapted to different temperatures.

In this study, we have subjected the psychrophilic and thermophilic fusion oxidoreductase by in vitro evolution in order to understand the structural mechanisms important for enzyme activity and stability.

III. Contents and scope

The genes of laccase and glucose dehydrogenase from the *Planococcus donghensis* and *Thermus thermophilus* HJ6, was cloned and expressed in *Escherichia coli* SoluBL21 cells. The biochemical properties of thermophilic

laccase have studied.

IV. Results

The open reading frames of laccase and glucose dehydrogenase from the *Planococcus donghensis* and *Thermus thermophilus* HJ6, were cloned and expressed in *Escherichia coli* SoluBL21 cells. *Thermus thermophilus* HJ6 laccase was formed inclusion bodies in *E. coli* cells. The resulting insoluble bodies were separated from cellular debris by centrifugation and solubilized with 6 M guanidine HCl. The solubilized protein was refolded by a simple on-column refolding procedure using Ni-chelation affinity chromatography and then the refolded protein was purified by gel filtration chromatography. The results from UV-visible absorption and electron paramagnetic resonance (EPR) analysis suggested that the enzyme had the typical copper sites, type-1, 2, and 3 Cu(II) of laccase. The purified enzyme exhibited the laccase activity with the optimal catalytic temperature at 75°C. The optimum pH for the oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and syringaldazine was 4.5 and 6.0, respectively. The recombinant protein showed high thermostability, and the half-life of heat inactivation was about 50 min at 85°C. The enzyme oxidized various known laccase substrates, its lowest K_m value being for syringaldazine, highest k_{cat} value for guaiacol, and highest k_{cat}/K_m for 2,6-dimethoxy-phenol. The enzyme reaction was strongly inhibited by the metal chelators and the thiol compounds. Although psychrophilic and thermophilic laccases differed in the optimal temperature for activity, both laccases were showed high homology for protein structure.

Contents

C h a p t e r 1 . I n t r o d u c t i o n	8
S e c t i o n 1 . O b j e c t o f r e s e a r c h	8
S e c t i o n 2 . N e c e s s i t y o f r e s e a r c h	9
Chapter 2. The present state of study in home and abroad	11
S e c t i o n 1 . T h e p r e s e n t s t a t e o f s t u d y i n a b r o a d	11
S e c t i o n 2 . T h e p r e s e n t s t a t e o f s t u d y i n h o m e	12
S e c t i o n 3 . T h e p r e s e n t s t a t e o f s t u d y i n s u b j e c t	12
C h a p t e r 3 . C o n t e n t s a n d r e s u l t s	14
S e c t i o n 1. Expression and biochemical properties of laccases from psychrophile and thermophile in <i>E. coli</i>	14
1 . I n t r o d u c t i o n	14
2 . M a t e r i a l s a n d m e t h o d s	15
3 . R e s u l t s a n d d i s c u s s i o n	18
S e c t i o n 2. Expression of GDHs from psychrophile and thermophile in <i>E. coli</i>	

1 . I n t r o d u c t i o n	34
2 . M a t e r i a l s a n d m e t h o d s	35
3 . R e s u l t s a n d d i s c u s s i o n	36
Chapter 4. Achievement and contribution rate of research	44
Section 1. Object and achievement rate of research	44
Section 2 . C o n t r i b u t i o n r a t e	45
Chapter 5. Plans of apply on study results	46
Section 1. N e c e s s i t y o f a d d i t i o n a l s t u d y	46
Section 2 . A p p l i c a t i o n i n t h e o t h e r s t u d y	46
C h a p t e r 6 . R e f e r e n c e s	47

목 차

제 1 장 서 론	8
제 1 절 연 구 개 발 의 목 적	8

제 2 절	연구 개발의 필요성	9
제 2 장	국내외 기술 개발 현황	11
제 1 절	국외 연구 동향	11
제 2 절	국내 연구 동향	12
제 3 절	세부 주제 별 연구 동향	12
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	14
제 1 절	저온균 및 고온균 유래 laccase의 대장균 발현 생산 및 생화학적 특성	4
1	서론	14
2	재료 및 방법	15
3	결과 및 고찰	18
제 2 절	저온균 및 고온균 유래 GDH의 대장균 발현 생산	34
1	서론	34
2	재료 및 방법	

.....	35
3 . 결 과 및 고 찰	36
제 4 장 연구 개발 목표 달성도 및 대외 기여도	44
제 1 절 연구 개발 목표 및 달성도	44
제 2 절 대 외 기 여 도	45
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획	46
제 1 절 추 가 연 구 의 필 요 성	46
제 2 절 타 연 구 에 의 응 용	46
제 6 장 참 고 문 헌	47

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

1. 연구 최종 목적

본 연구에서는 생명정보학적, 합성생물공학적 기법을 이용하여 저온 및 고온 단백질의 융합화 전략을 구체화하고 이를 바탕으로 산업적 생물전환 및 소재개발에 부합하는 단백질 고활성화 및 안정화 획득 방식을 개발하고자 한다. 당해년도 세부 연구목표로

는 저온 및 고온성 산화환원효소를 조사하여 이들의 유전자를 클로닝하고 대장균에서 발현 및 생산하여 효소학적 특성을 검토하고, 효소 분자의 구조 모델링을 통하여 분자 구조를 비교 분석하는 것을 목적으로 한다.

2. 연구개발 세부목표

성과목표	세부목표	세부 주요내용
저온 및 고온성 산화환원효소의 특성 규명 및 분자구조 분석	저온 및 고온성 산화환원효소의 클로닝 및 발현 생산	- 저온균(<i>Planococcus donghaensis</i>) 유래 laccase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산 - 저온균(<i>Planococcus donghaensis</i>) 유래 glucose dehydrogenase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산 - 고온균(<i>Thermus thermophilus</i> HJ6) 유래 laccase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산 - 고온균(<i>Thermus thermophilus</i> HJ6) 유래 glucose dehydrogenase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산
	산화환원효소의 생화학적 특성 규명 및 분자 구조 분석	- 고온균 유래 laccase의 효소 활성 및 기질 특이성 검토 - 저온 및 고온성 효소분자의 구조 모델링 및 분자구조 비교 분석

제 2 절 연구개발의 필요성

자연계에 존재하는 저온균, 중온균 및 고온균 유래의 효소들은 각각 저온, 중온, 고온의 조건에서 효율적인 촉매 반응을 완성한다. 남극 및 북극과 같은 추운 지방에서 발견되는 저온균 유래 효소들은 단백질 2차 구조상에서 많은 α -helix와 적은 β -sheet 구조를 가져 유연한 분자구조를 가지고, 고온성 효소에 비해 극성 아미노산이 많고 소수성 아미노산이 적으며 단백질 domain 간의 상호작용이 적기 때문에 단백질에 유연성이 제공된다. 또한 이런 유연성으로 인하여 저온성 효소는 중온 및 고온성 효소에 비해 높은 비활성(specific activity)을 가지는 것으로 알려져 있다(Feller, 2003; Smalas, 2000). 그러나 저온성 효소는 유연한 구조로 인해 열에 약하고 구조적

으로 불안정하여 산업적인 적용에 있어서는 한계점이 있다. 반면, 고온성 효소들은 아미노산간의 이온결합의 증가와 소수성 아미노산의 밀집으로 인하여 구조적인 고정성을 가지게 되고 이로 인하여 열에 대한 구조적 안정성을 획득하게 된다. 반면에 구조적인 고정성으로 인해 저온성 효소에 비해 효소의 비활성이 낮다는 단점을 가지고 있다.

자연적으로 진화된 효소와 인공적으로 조작된 효소와의 비교 연구를 보면, 대부분의 효소들은 안정성을 위해서 구조적인 고정성이 요구되고 효소 활성을 위해서는 유연성이 필요하게 된다(feller and Gerday, 2003; Jaenicke, 1981). 이와 같이 효소는 목적에 맞는 구조적 특성이나 새로운 기능을 지닌 단백질을 설계하는 방향으로 다양한 연구가 진행되고 있다. 1980년대에 부위특이적 돌연변이기술(site-directed mutagenesis)이 발표된 이후로 진화분자공학(directed evolution)의 핵심기술인 DNA shuffling technology (Stemmer, 1994) 및 Error-prone PCR (McCullum, 2010)방법을 바탕으로 한 무작위적 돌연변이기술(random mutagenesis)을 사용하여 효소 개량 연구가 진행되고 있다. 분자진화기술(directed molecular evolution)은 자연계의 진화현상을 in vitro에서 인위적으로 가속화시켜 단기간 내에 우리가 원하는 성질을 갖는 유전자를 선별하는 기술을 말한다. 즉, 서로 다른 돌연변이를 가지고 있는 상동 유전자군으로부터 유전자의 일부를 서로 바꾸어 다양한 재조합 유전자 라이브러리(random mutants library)를 만들어내고, 이 library로부터 유용한 유전자를 선별하는 기술을 말한다. 그러므로 재조합 유전자 라이브러리 제조기술과 더불어 다양한 재조합 유전자 변이체들 중에서 원하는 유전자 변이체를 간편하고, 빠르며, 대량으로 선별할 수 있는 탐색 기술, 즉 HTS(High-Throughput Screening) 기술 또한 중요하다.

효소의 산업적 적용에 대한 공통적인 문제점은 열에 의한 불활성화이고, 산업용 효소의 주된 요구사항은 열안정성이다. 동시에 낮은 온도에서 높은 촉매활성을 가지는 효소들은 에너지 절약 차원에서 경제적이고 환경적인 이득을 줄 수 있다. 저온균(*Planococcus donghaensis*)과 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6, *Geobacillus* sp. AR1) 유래 laccase는 25~27%의 상동성을 나타내고, 저온균(*Planococcus donghaensis*)과 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 glucose dehydrogenase는 37%의 비교적 높은 상동성을 나타내기 때문에 급격하게 다른 온도 조건에 적응하는 효소의 구조적 안정성과 활성과의 관계를 이해하기 위한 좋은 재료로 생각된다. 이론적인 단백질의 구조 설계는 효소의 온도 적응을 위한 몇 가지 특별한 메커니즘을

제공할 수 있다. 그러나 높은 안정성과 활성을 가진 효소를 개량하기 위해서는 이런 방법으로는 한계가 있고 무작위적 돌연변이기술이 더욱 가능성이 높다고 할 수 있다.

본 연구에서는 산화환원효소인 laccase와 glucose dehydrogenase에 대하여 효소 활성과 안정성에 관한 중요한 아미노산 잔기들을 동정하기 위하여 저온 및 고온성 효소의 융합형 진화과정을 수행한다. 또한 효소 활성값의 분석과 구조 모델링 연구를 통하여 야생형과는 다른 저온 또는 고온에서 안정성과 활성이 향상된 변이체를 선별하도록 하고, 최종적으로는 저온성 효소에서 활성과 안정성과의 복잡한 구조적 관계를 이해하도록 한다.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 연구 동향

1. 효소 최적화에 관한 연구

독일 막스 플랑크 (Max Planck) 연구소의 화학자들이 효소를 실용적인 관점에서 최적화하는 방법을 개발했다. 이 연구성과는 미 학술원 회보지 (Proceedings of the National Academy of Sciences)에 발표되었다(Wu, 2010). 유전자 조작으로

막스 플랑크 연구소의 화학자들이 monooxygenase 를 변환시켰다. 다양한 기질을 다룰 수 있도록 만든 것이다. 이들은 생촉매의 결합 지점과는 멀리 떨어진 곳에 있는 두개의 아미노산을 치환했다. 이 치환은 효소의 전체적인 구조를 바꿔서 더 많은 수의 다양한 화합물들을 변환할 수 있도록 한 것이다. 게다가 이는 전통적인 합성시 생기는 라세믹(racemic) 화합물이라 알려진 두개의 거울상 이성질체(enantiomer) 중에 하나를 더 많이 생산한다. 이 거울상 이성질체들은 화학적으로는 동일하지만 구조상 다르다. 이 두 개 중 한가지만이 의학적으로 유용하다. 이 연구덕분에 화학 산업계의 요구뿐만 아니라 제약업계의 요구도 충족하는 맞춤형 효소의 전환이 가능하게 되었다.

2. 저온 적응 효소 연구

단백질 결정연구, 상동성 모델 연구, 아미노산 서열 분석을 통해서 촉매효율의 증가와 안정성 저하에 대한 공통된 구조적인 특징을 설명하기는 어렵지만 다음과 같이 효소 안정성에 대한 몇 가지 중요한 특징(분자 내 수소결합, 이온결합, proline, methionine, glycine, arginine의 수, 분자표면의 잔수성, helix 안정성, core packing 등)이 보고 되었다(Smalas, 2000). 저온 적응 효소는 촉매 효율 증가와 안정성 감소를 동반하는 분자의 유동성을 확보하기 위하여 몇 가지 구조적인 조정이 필요하고, 활성 부위에서 정전기적인 최적화에 의해 효소 활성이 증가한다.

3. 저온, 중온, 고온 효소에 대한 극한 온도에서의 적응 연구

효소의 활성/유동성/안정성의 관계를 이해하기 위하여 저온, 중온 및 고온성 ligase의 3차원 모델 비교, 활성값, 표면 소수성, 구조적 투과성, 구조 안정성, 열변성을 통하여 연구를 수행하였다(Georlette, 2003). 저온성 효소는 저온에서 활성이 증가하고 분자 구성물의 불안정성 및 높은 구조적 유동성을 동반하였다. 반대로 중온 및 고온성 효소들은 저온 활성이 감소하고, 높은 안정성과 낮은 유동성을 보였다.

제 2 절 국내 연구 동향

1. In vitro coevolution에 의한 맞춤형 산화환원효소의 개발

가. 산화환원효소(amine oxidase 및 polyol dehydrogenase)의 분자 구조 분석

산화환원효소의 분자 모델 구축 및 다양한 기질의 docking 분석과 산화환원효소의 결정구조와 분자모델과의 비교 분석을 통한 기본 데이터를 확립하였다.

나. In vitro coevolution에 의한 산화환원효소 기질특이성의 분자기반 규명

신규 기질특이성 갖는 효소 개발 위해 기질과 효소의 단계적 coevolution 기법을 도입하였고, 효율적인 coevolution 위해 in silico 스크리닝과 시험관 진화의 hybrid법을 사용 하였다. 산화환원효소의 목적 기질에 대한 활성을 갖는 효소 변이체를 확보하고, 구조분석 및 특이성에 대한 분자기반의 규명을 완성하였다.

제 3 절 세부 주제별 연구동향

1. Laccase에 관한 연구 활용

라카아제는 식품산업에서 페놀 유도체들의 선택적인 제거를 통하여 과일주스, 포도주 및 맥주와 같은 음료의 안정화에 사용하고, 오래된 병 포도주에 생기는 독특한 코르크 감염과 수축을 산화적 방법으로 감소시킨다. 라카아제의 주요한 기술적 이용은 직물, 염색 또는 인쇄 공업에서 염료의 탈색과정이고, 펄프와 제지공업에서 목질섬유의 리그닌 분해 과정에 이용된다. 또한, 벤질, 알릴, 프로파길, 지방족 알코올의 알데히드와 케톤으로의 산화와 제약 화합물(마취제, 항염증제, 항생제, 진정제)의 합성 및 바이오센서 및 바이오연료전지 분야에 사용하는 등 다양한 활용가치를 가지고 있다.

2. Glucose dehydrogenase에 관한 연구 활용

바이오연료전지의 음극에서 glucose 또는 다른 탄수화물에서 전자를 생성하는 역할을 수행하므로 바이오연료전지의 핵심 촉매 효소로서 활용하고 있다.



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 저온균(*Planococcus donghaensis*) 및 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase의 대장균 발현 생산 및 생화학적 특성

1. 서론

Laccase (EC 1.10.3.2)는 구리를 함유하는 multicopper oxidase의 일종으로 대부분 3가지 cupredoxine-type domain으로 구성된 비슷한 구조를 가진다. 이들 효소는 monophenols, polyphenols, methoxy-substituted phenols, aromatic amines, lignin을 포함하는 많은 페놀 화합물들을 산화시키므로 다양한 기질 특이성을 가진다 (Thurston, 1994). 대부분의 laccase는 3개의 구리이온을 함유하며 단백질 구조 내에 3가지 (type-1, type-2, type-3)의 구리결합자리를 가지고 있다. 효소반응에서 기질의 산화반응은 type-1 구리에 의해 촉매 되어 전자는 trinuclear cluster (1개의 type-2 copper와 2개의 type-3 copper로 구성)을 따라 이동하고, 산소분자의 환원과 물 분자의 방출을 동반하게 된다. 이런 전자이동 메커니즘을 바탕으로 laccase는 monomer의 교차연결, polymer의 분해 및 방향족 화합물의 개열에 관여한다. 이와 같이 laccase는 다양한 기질 특이성뿐만 아니라 폭넓은 반응 능력 때문에 염료 탈색 (Claus, 2002), 펄프 표백 (Palonen, 2004), 생물학적 환경 정화 (Murugesan, 2003), 폴리머 합성 (Huttermann, 2001), 바이오센서 (Peter, 1997) 및 바이오 연료전지 (Liu, 2011) 등의 여러 분야에서 활용되고 있다.

Laccase는 곰팡이 (Baldrian, 2006), 식물 (Mayer, 1987), 곤충 (Dittmer, 2004) 및 세균 (Arias, 2003; Martins, 2002)에서 다양하게 분포하고 있지만 고등생물에서는 발견되지 않는 것으로 알려져 있다. 생명공학적인 적용에는 곰팡이 유래의 laccase가 주로 사용되었고 (Alexandre, 2000), 최근 다양한 세균의 전체 게놈분석이 빠르게 진행됨에 따라 세균 유래 laccase에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 세균 유래 laccase는 유전학적 도구와 생물공학적 공정이 잘 확립되어 있고, 특히 고온성 세균 유래 laccase는 거친 산업적 환경에서 효소의 안정성을 유지할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 현재, 고온성 세균 중에서는 *Thermus thermophilus* HB27 유래 laccase (Miyazaki, 2005)와 *Aquifex aeolicus* 유래 metallo-oxidase (Fernandes, 2007)의 특성이 밝혀졌고, 각각 92°C와 75°C의 높은 최적반응온도를 가지는 것으로 나타났다.

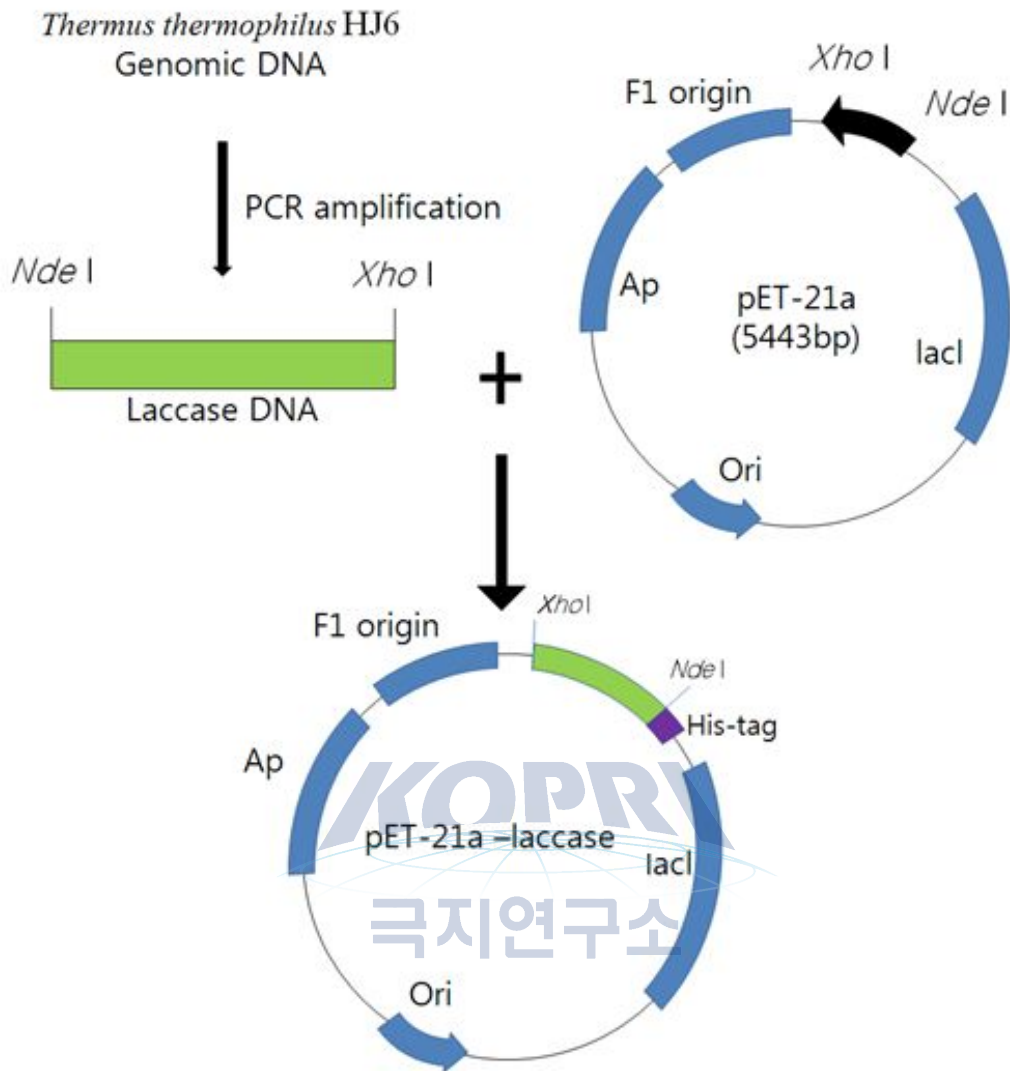
본 연구에서는 저온균 (*Planococcus donghaensis*) 및 고온균 (*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase를 생산하기 위하여 저온균 및 고온균의 laccase를 암호화하는 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 또한 pPAL7 또는 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 대장균에서 재조합 laccase를 생산 및 정제하고 효소학적 특성을 분석 하였다.

2. 재료 및 방법

가. Laccase 유전자 클로닝 및 발현 vector 구축

저온균 및 고온균의 염색체는 GeneAll GENEx Genomic kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. Laccase 유전자를 클로닝 하기 위하여 게놈 염기서열이 밝혀진 *T. thermophilus* HB27 및 *Planococcus donghaensis*의 laccase 유전자 염기서열을 바탕으로, 각각 개시코돈의 상류와 종결코돈의 하류에 해당하는 두가지 primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR은 Pfu DNA polymerase (INTRON Biotech., Korea)를 사용하여 DNA 단편을 증폭하였고 Topo blunt vector (Enzynomics, Korea)에 클로닝 하였다. 클로닝 된 DNA 단편의 염기서열은 ABI Prism 3700 genetic analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다. 발현벡터 pPAL7 또는 pET-21a에 효소 유전자를 클로닝하기 위하여 ORF를 바탕으로 2가지 primer를 제작하고 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 *Nde* I과 *Xho* I으로 절단 한 후 같은 효소로 절단한 후 pPAL7 또는 pET-21a 벡터에 연결하고 *E. coli* DH5α에 형질전환하였다. pET-21a로 발현한 단백질은 C-말단 쪽에 His-tag가 부착된 융합 단백질의 형태로 생산되었다. 아래 그림 1은 클로닝 모식도를 나타낸다.

그림 1-1. 효소 유전자의 클로닝 모식도



나. 효소 생산 및 정제

Laccase 발현백터를 *E. coli* SoluBL21(DE3)에 형질전환한 후 50 μ g/ml의 ampicillin과 kanamycin을 첨가한 LB 배지(triptonen 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)에서 37 $^{\circ}$ C로 16시간 동안 전배양 하였다. 전배양액을 새로운 배지에 접종한 후, 흡광도(A₆₀₀)가 0.5가 되었을 때 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 0.3 mM 농도로 첨가하고 25 $^{\circ}$ C로 16시간 유도배양 하였다. 배양된 균체를 원심분리를 통하여 침전하고 buffer A (20 mM sodium acetate, pH 6.0, 250 mM NaCl, 0.1 mM CuSO₄)에 녹인 다음 초음파로 파쇄하였다. 초음파 파쇄 후 원심분리하여 상등액과 침전을 회수하였다. 고온성 laccase의 경우 대부분 불용성 획분에 발현

생산되었기 때문에 다음과 같이 in vitro refolding 방법으로 효소를 가용화하여 사용하였다. 먼저 초음파 후 침전물을 binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M guanidine HCl, 5 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol)에 완전히 녹인 후 HisTrap HP column (GE Healthcare, bed volume, 5 ml)에 흘려 컬럼 수지에 부착시킨다. 50ml의 washing buffer (20 mM Tris.HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M urea, 20 mM imidazole and 1 mM 2-mercaptoethanol)를 흘린 후에 150 ml의 Refolding buffer (20 mM Tris.HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 20 mM imidazole)로 gradient를 주어 컬럼 안에서 효소를 refolding 시킨 후에 50 ml의 Elution buffer (20 mM Tris.HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 500 mM imidazole)를 흘려 가용화된 효소를 용출하였다. 용출된 획분 중에서 활성이 있는 획분을 모아 Amicon (Milipore) filter로 농축한 다음 buffer C (20 mM sodium acetate, pH 5.0)로 투석하였다. 단백질의 정제도는 SDS-PAGE (10% acrylamide gel)을 통하여 확인하였고, 전기영동 밴드는 coomassie staining으로 염색하였다.

다. Laccase 활성 측정법

Laccase 활성은 정제된 효소를 0.1 mM CuSO_4 를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에서 1 mM guaiacol을 기질로 하여 75°C에서 10분간 반응한 후 흡광도 470 nm에서 측정하였다. 효소의 pH 의존성은 50 mM sodium acetate (pH 4.0~5.5), 50 mM sodium phosphate (pH 5.5~7.0), 50 mM Tris-HCl (7.0~8.5), 50 mM glycine-NaOH (8.5~10.0)의 buffer를 사용하여 측정하였고, 온도 의존성은 50 mM sodium acetate (pH 5.0) buffer를 사용하여 40~100°C 범위에서 측정하였다. 효소의 kinetic 값은 다양한 기질(2,2'-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS), guaiacol, 4-hydroxyindole, 4-methylcatechol, catechol, syringaldazine)을 사용하여 측정하였다.

라. UV-visible 및 EPR 스펙트럼 측정

재조합 Laccase의 UV-visible 흡수 스펙트럼은 20 mM sodium acetate (pH 5.0)에서 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys, Korea)를 사용하여 측정하였다. 전자상자성공명(electron paramagnetic resonance, EPR) 스펙트럼은 Bruker EMX spectrometer (X-band) (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany)를 사

용하여 측정하였고 단백질은 0.27 mM의 농도로 10% glycerol, 90% 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase의 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산

저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase를 암호화하는 유전자를 클로닝 하기 위하여, 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *Planococcus donghaensis*의 laccase 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 laccase를 암호화하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자의 open reading frame (ORF)는 912 bp의 길이로 303 아미노산을 암호화하고 있었다(그림 1-2). 예상된 분자량은 34,223 Dalton이고, 등전점은 7.15 이었다. 저온균 유래 laccase를 pPAL7 발현벡터를 이용하여 대장균에서 발현한 결과 단백질의 N-말단에 eXact tag (8.5 kDa)가 융합되어 42.5 kDa의 융합 단백질이 생산되었다. 그림 1-3에서와 같이 대조구와 비교한 결과 생산량은 많지 않은 것으로 확인되었다.

```
1 ttgcacagtc aacatcgtca atttaatatc aattcgacag tccggctctt taatgcagct
61 gggctgtctt tttttacgct taacttgttt catattgctg tacttctggt ttggcttatt
121 ttatatitaa aaaaggtgat gacattgaaa gtaaaatitt atgcgaacaa tactaatitt
181 gtatctggca taacattaaa agagttagct gctcctgaag agaataatat ggctttgcat
241 gcttgcaaaa acccagaggc ggttttatca aatcgaaaaa gtttagcgga atttctagac
301 gtttctctgg atgattttat ttgtacgcaa caaacacata gtgcgaactt ccgacgcgtc
361 gatagacatc gtaaaggacg tggagcgtat actgtcgaaa ccgccatttc tgatacggac
```

421 ggtttgtata ctttcgatcc tgggaattgta ttgtgcagct ttgcagccga ctgtgctcct
481 gttattattc acgataaaac aacgggatta attggtgtga tccattccgg atggcaaggc
541 actgttaaag aaattacgct taaattttta aagcacatca tttccataga acaatgtaat
601 cctaccgatt tagagattca aattggcgca tctattagcc aacaacagtt tgaagtcgac
661 caagatgttt atttaaagtt tgaactttg ggatacgcta atgaatttat gtattttaat
721 tcggctacga ataaatatca tatcgacaac caagctactg taaaaaaca atgcgaactt
781 gctggaattc cttctagtca gattctcggt gattctacat gtacgttttt aaattccgat
841 ggattttcct accgtcaaga tcgtaaatgt ggcaggcatt taatttttgc tattaacaaa
901 aatacgcaat ag

1 mhsqhrqfni nstvrlnaa glsfftlnlf hiavllfwli lylkkvmtlk vkfyanntnf
61 vsgitlkela apeennmah acknpeavls nrkslaefld vslddfictq qthsanfrrv
121 drhrkgrgay tvetaisddt glytfdpgiv lcsfaadcap viihdkttgl igvihsgwqg
181 tvkeitlkfl khiisieqcn ptdleiqiga sisqqqfevd qdvylkftl gyanefmyfn
241 satnkyhidn qatvkkqcel agipssqilv dstctflnsd gfsyrqdrkc grhlifaink
301 ntq

그림 1-2. *Planococcus donghaensis* 유래 laccase의 DNA 염기서열 및 아미노산 서열

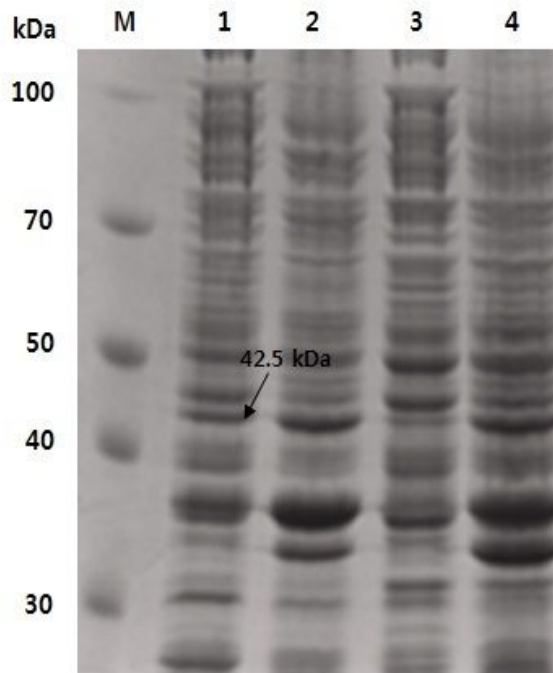


그림 1-3. 저온균 유래 laccase의 발현 생산. M, 분자량 marker; 1, 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 상등액; 2, 효소발현 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 침전액; 3, 대조구 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 상등액; 4, 대조구 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 침전액.

나. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase의 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산

고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase의 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산 유래 laccase를 암호화하는 유전자를 클로닝 하기 위하여, 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *T. thermophilus* HB27의 laccase 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 laccase를 암호화 하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자의 open reading frame (ORF)는 729 bp의 길이로

242 아미노산을 암호화하고 있었다(그림 1-4). 예상된 분자량은 26.2 KDa이고, 등전 점은 8.92 이었다. 클로닝 된 유전자는 *T. thermophilus* HB27 유래의 laccase와 가장 높은 상동성(99% identity)을 나타내었고, *Escherichia coli* 유래 laccase, *Geobacillus stearothermophilus* 유래 laccase, bovine rumen 유래 polyphenol oxidase와 각각 31.1%, 37.6%, 26.3%의 identity를 나타냈다. 이와 같은 생물정보학 분석을 통하여 *T. thermophilus* HJ6의 염색체로부터 클로닝 한 유전자는 laccase를 암호화하는 것으로 예상되었다. 이 유전자는 NCBI 염기서열 데이터베이스에 새로운 laccase 유전자로 등록하였다(GeneBank Accession No. GU233492).

His-tag 유전자를 포함하는 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 *T. thermophilus* HJ6 laccase (Tt-laccase) 유전자를 클로닝 하고 pET-LAC으로 명명하였다. 여기서 효소 생산을 위한 숙주 균주로는 *E. coli* SoluBL21(DE3)를 사용하였다. Plasmid pET-LAC을 사용하여 *E. coli* SoluBL21(DE3)를 형질전환하였고, 37°C에서 배양하여 흡광도(A_{600}) 값이 0.5~0.6에 도달하였을 때 IPTG를 첨가하여 단백질 생산을 유도하였다. 고온균 유래 laccase를 *E. coli* SoluBL21에서 발현한 결과 불용성 과립(inclusion body)을 형성하였다(그림 1-5). 따라서 화학용제를 사용한 in vitro refolding을 시도하였다. 단백질의 불용성 과립을 포함하는 초음파 침전액을 6 M guanidine HCl을 사용하여 가용화하고 metal-chelating column에 고정화한 후 1 mM CuCl_2 용액을 사용하여 6 M guanidine HCl을 천천히 제거하면서 refolding을 시도하였고, 이후 imidazole을 사용하여 column에서 용출하였다. 그 결과 27 kDa의 가용성 laccase 단백질이 정제 되었다(그림 1-5). 정제된 단백질은 생화학적 특성을 분석하는데 사용하였다.

1 gtgacctcc tgcgcacccc cctcccgggtg cccacggct tcaccacccg ggaaggcggg

61 gtctccgagg ggcccttccg cagcctcaac ctctccgccg ccaccgggga cgaccccgag

121 aggggtggccg agaaccagcg ccgggtgctc gcggccttcg gccatccgcc cgtggcgggc
181 ctccgccagg tccacggcac ggaggtccac ccggtggagg ggccggggct ctgggagggg
241 gacggcctcc tcacccgcac ccccggcctc ctctccggg tgggggtggc cgactgctac
301 cccctcctcc tctaccaccc gaagggggcc gtggggggcc tgcacgccgg ctggcgccgg
361 gtggtggggg ggatcctgcc caaggccctg gagcgctcg aggcgtcta ccgcctggac
421 cctacggagg tccacctgc catcgccccc gggatcgggg gggcgtgcta ccaggtgggc
481 gaggaggtgg tggcccgtt cgccgaggcg gggcttttca ccttccgca ggaccccgcc
541 gccccgggga agtacctctt ggacctgaa aaggccctcc tcctccaggc gcggcgggcg
601 gggcttaggg aggagcggat ctaccgggtg gggctttgca cccactgcgc cccaacctc
721 ccccgtaa

1 mtllrtplpv phgfttregg vsegpfrsln lsaatgddpe rvaenqrrvl aafghppvag
61 lrqvhgtevh pvegpglweg dgltrtpgl llrvgvadcy plilyhpkga vgalhagwrg
121 vvggilpkal erleavyrld ptevhlaigp gaggacyqvg eevvarfaea glftfredpa
181 apgkylldle kalliqrara glreeriyrv glcthcapnl fshrrdrgrt grmwglvmlp
241 pr

그림 1-4. *Thermus thermophilus* HJ6 유래 laccase의 DNA 염기서열 및 아미노산
서열

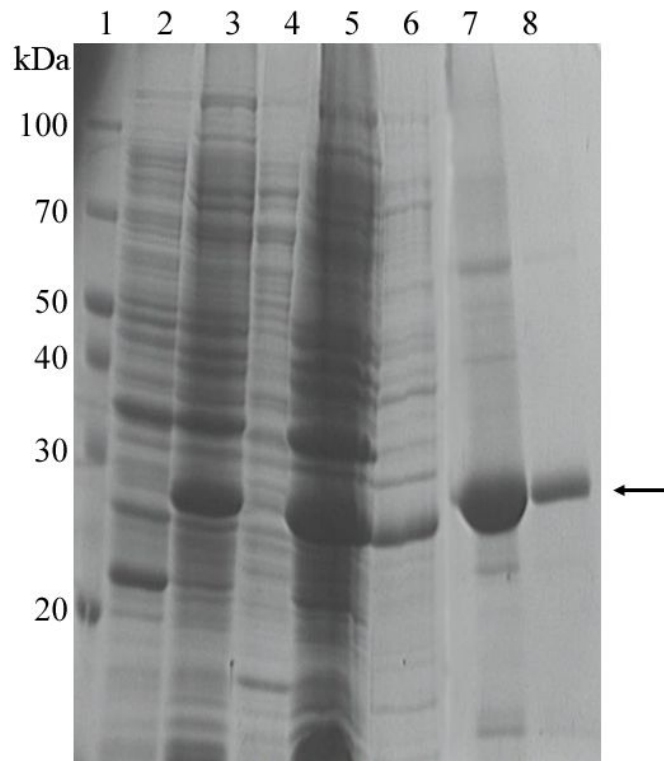


그림 1-5. 고온균 유래 laccase의 발현 생산 및 정제. 1, 분자량 marker; 2, 대조구 대장균 균체의 초음파 파쇄액; 3, 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄액; 4. 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄 상등액; 5, 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄후 침전액; 6, 초음파 침전액의 6 M guanidine HCl에 의한 가용화액; 7, refolding 된 laccase의 metal-chelating column 정제액; 8, gel filtration chromatography에 의해 정제된 laccase액

다. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase의 UV-visible 흡수 스펙트럼

Laccase는 일반적으로 구리를 함유하기 때문에 파란색을 나타낸다. 정제된 laccase의 UV-visible 흡수 스펙트럼을 측정한 결과, 본 효소는 type I 또는 blue copper center에 상응하는 605 nm에서 peak를 보였고, type III binuclear copper center에 상응하는 330 nm 근처에서 상승하는 peak 형태를 나타내었다(그림 1-6A). 이와 같

은 흡수 스펙트럼의 결과는 다른 laccase에서도 공통적인 특징으로 알려져 있다. 본 효소를 EPR spectrum으로 분석한 결과 type2 Cu(II) signal이 $g_{\parallel} = 2.23$, $A_{\parallel} = 0.0194 \text{ cm}^{-1}$, and $g_{\perp} = 2.05$ 으로 확인되어 이전에 보고된 Rumen polyphenol oxidase (RL5)의 signal 값(2.23 , 0.0195 cm^{-1} , and 2.05)과 유사하여 T1, T2, T3의 구리 부착부위를 모두 가지는 laccase로 판명되었다(그림 1-6B).

라. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase의 생화학적 특징

Laccase의 구리농도에 대한 효소 활성의 의존성은 $0.0001 \sim 1 \text{ mM CuSO}_4$ 의 범위에서 guaiacol을 기질로 사용하여 75°C 에서 10분간 반응하여 활성을 측정하였다. 그 결과 구리농도 의존성은 S자 형태였고, 최대 활성에 대한 midpoint는 $154 \mu\text{M}$ 로 나타났다(그림 1-7A). pH 의존성은 pH 3~9의 범위에서 overlapping buffer를 사용하여 측정하였다. 그 결과 ABTS와 syringaldazine에 대해서 각각 4.5와 6.5의 최적 pH를 나타내었다(그림 1-7B). Laccase를 $30 \sim 90^{\circ}\text{C}$ 의 범위에서 활성을 측정한 결과, 75°C 에서 가장 높은 활성을 나타내어 기존에 보고된 이종의 laccase에 비해 높은 최적온도를 나타내었다(그림 1-7C). 또한, 본 효소는 70°C 에서 100분 동안 열처리한 후에 100%의 활성을 유지하였고, 85°C 에서는 50분 만에 활성의 반감기를 나타내어 매우 높은 내열성을 가지는 것으로 확인되었다 (그림 1-7D). Laccase의 기질 특이성을 검토하기 위하여 다양한 페놀 및 비페놀 화합물에 대하여 75°C 에서 활성을 측정하였다. 효소 활성과 기질 농도와의 관계를 나타내는 kinetic 값은 Michaelis-Menten 식과 least squares method을 이용하여 계산하였다. 본 효소는 syringaldazine에 대해 가장 높은 친화도를 나타내었고, guaiacol에 대해서는 가장 높은 분자촉매상수(k_{cat})을 보였다. 또한 효소의 촉매 효율(k_{cat}/K_m)은 2,6-DMP이 가장 높은 값을 나타내어, 본 효소의 가장 효과적인 기질인 것을 알 수 있었다(표 1).

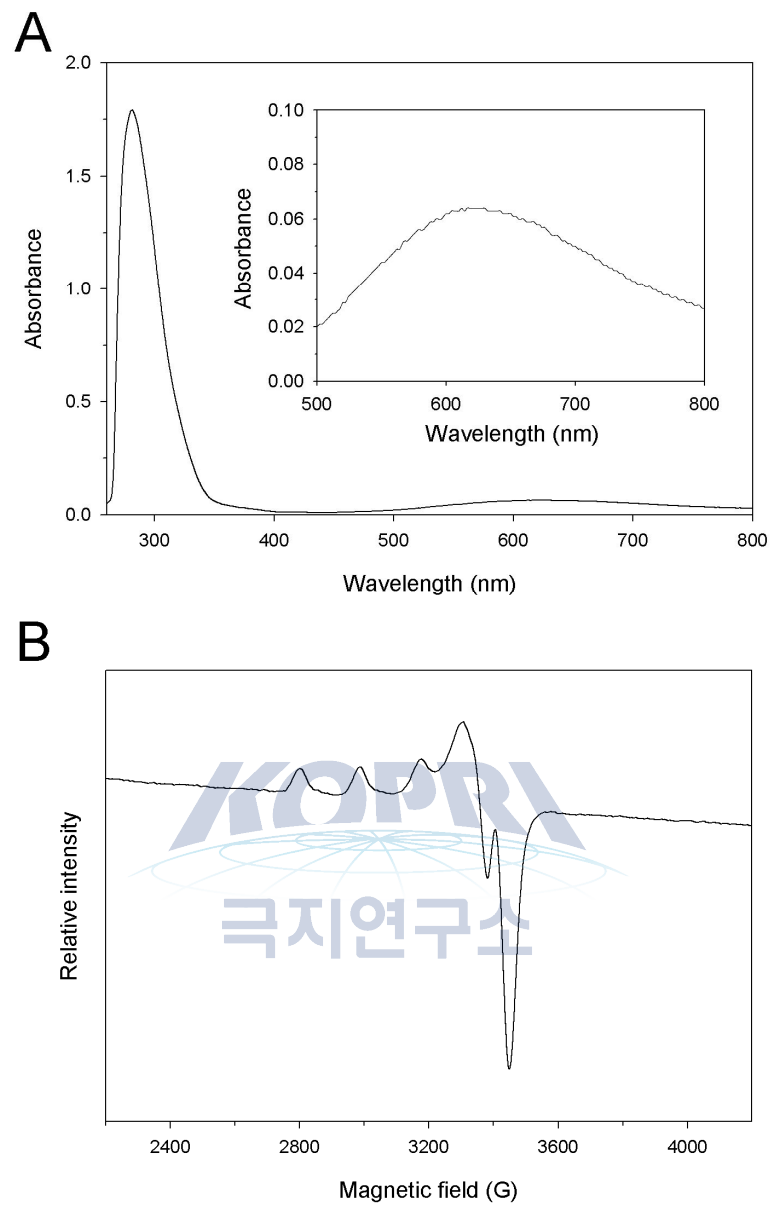


그림 1-6. Laccase의 (A) UV-visible absorption spectrum과 (B) EPR spectrum.

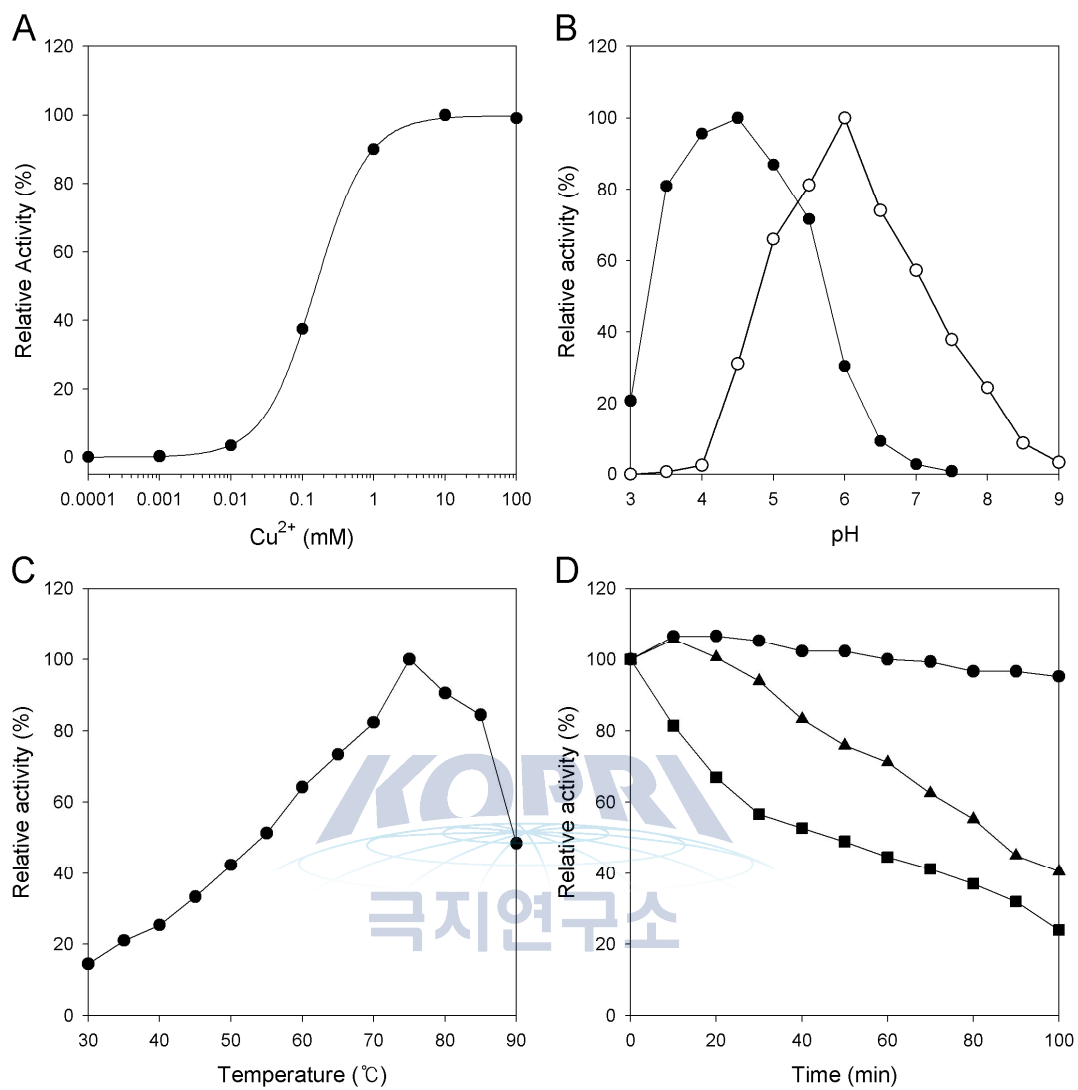


그림 1-7. Laccase의 촉매 활성화에 대한 특징. A, 구리농도 의존성; B, pH 의존성 [ABTS(●), syringaldazine (○)]; C, 온도 의존성; D, 열안정성[75°C (●), 80°C (▲), 85°C (■)].

표 1. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 Laccase의 기질 특이성

Substrate	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Wavelength h (nm)	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
2,6-Dimethoxy-phenol	35,645	470	0.11	2.93	26.63
Syringaldazine	65,000	530	0.04	0.35	8.75
Guaiacol	12,100	465	0.73	3.75	5.14
Catechol	2,211	450	0.83	3.06	3.68
ABTS	36,000	420	0.49	1.48	3.02
4-Methylcatechol	2,091	420	0.96	1.48	1.54
Pyrogallol	4,400	450	1.83	1.09	0.59

극지연구소

표 2. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 Laccase에 대한 저해제의 효과

Compound	Concentration (mM)	Inhibition (%)
L-cysteine	1	55.3
	10	100.0
Sodium azide	1	67.3
	10	100.0
EDTA	1	72.9
	10	100.0
Tropolone	1	50.5
	10	100.0
Dithiothreitol	1	94.4
	10	100.0
2-Mercaptoethanol	1	100.0
	10	100.0
<i>p</i> -Coumaric acid	1	58.0
	10	75.8
Acetyl acetone	1	17.1
	10	27.0

마. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase의 활성화에 대한 금속이온 및 저해제의 효과

본 효소의 활성화에 대한 금속이온 및 inhibitor의 효과를 알아보기 위해 다양한 금속

이온 및 저해제의 존재 하에서 guaiacol을 기질로 사용하여 75℃에서 효소 활성을 측정하였다. Multicopper oxidases (MCOs)의 경우 Cu^+ 뿐만이 아니라 Fe^{2+} 와 Mn^{2+} 의 존재 하에서도 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있지만, 본 효소에 관해서는 오직 Cu^+ 에 대해서만 효소 활성을 나타내어 MCO와는 다른 전형적인 laccase의 특징을 보였다 (data not shown).

Laccase의 저해제에 대한 효과를 조사한 결과 금속착화합물인 NaN_3 , EDTA, tropolone, *p*-coumaric acid와 thiol 화합물인 L-cysteine, DTT, 2-mercaptoethanol은 효소활성을 강하게 저해하였다(표 2). 반면, *p*-coumaric acid 및 acetyl acetone은 다른 compound와 비교하여 상대적으로 낮은 저해 효과를 나타내었다. 저해제 중에서 sodium azide는 단백질 구조 안에 존재하는 구리 원자와 결합하여 전자의 이동을 방해했을 것으로 예상된다. 또한, 본 효소에 대한 dithiothreitol과 2-mercaptoethanol의 강력한 활성 저해는 효소활성부위의 구리원자와 thiol 화합물간의 배위결합이 원인이 것으로 생각된다.

바. 저온 및 고온성 laccase의 아미노산 서열 비교 분석

고온균(*Thermus thermophilus* HJ6)과 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase는 25.4%의 identity를 나타내었고 고온 및 저온에 대한 온도환경이 정반대임에도 불구하고 단백질의 N-말단을 제외하면 비교적 높은 상동성을 가졌다(그림 1-8). 또한 다른 고온균(*Geobacillus* sp. AR1)과 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase는 27.4%의 Identity를 나타내어 N-말단을 비롯한 전체 배열에서 높은 상동성을 가졌다(그림 1-9).

사. 저온 및 고온성 laccase의 구조 모델링 및 3차 구조 비교

고온균(*Geobacillus* sp. AR1, *Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase와 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase에 대하여 3차 구조를 비교하기 위하여 단백질 모델링사이트(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)의 프로그램을 사용하여 각각 단백질의 3차 구조를 모델링 하였다. 저온 및 고온성 laccase는 무려 50℃나 차이나는 최적온도 환경에도 불구하고 단백질의 전체적인 3차 구조는 매우 흡사하였다. 다만, 고온성(*Geobacillus* sp. AR1) laccase는 저온성(*Planococcus donghaensis*) laccase에는 존재하지 않는 짧은 α -helix구조가 존재하였다(그림

1-10). 또한 저온성(*Planococcus donghaensis*) laccase는 효소 중심 부위에 고온성 laccase에는 존재하는 β -sheet 구조가 존재하지 않았다. 이들 부분이 내열성과 활성에 미치는 영향에 대해서는 추후 아미노산 변이체를 제작하여 조사할 예정이다.



Thermus	-----MTLLRTPLPVPHGFTTREGGV
Planococcus	MHSQHRQFNINSTVRLFNAAGLSFFTLNLFHIAVLLFWLILYLKKVMTLKVKFYANNTNF : * : : : * : : .
Thermus	SEG-PFR-----SLNLSAATGDDPERVAENQRRVLAAGHPPV-----AGLRQ
Planococcus	VSGITLKELAAPEENNMAHACKNPEAVLSNRK-SLAEFLDVSLDDFICTQQTHSANFRR . * : : . * : : : : * * * . : * : :
Thermus	VH----GTEVHPVEGPGWLWEGDLLTRTPGLLLRVGVADCYPLLLYH-PKGAVGALHAGW
Planococcus	VDRHRKGRGA-YTVETAISDTDGLYTFDPGIVLCSFAADCAPVISHDKTTGLIGVISHGW * . * . . : : * * * * * : * . * * * : : . * : * : * * :
Thermus	RGVVGGLPKALERLEAVYRLDPTVHLAIGPGIGGACYQVGEEVVARFAEAGLFT-FRE
Planococcus	QGTVKEITLKFLKHIISIEQCNPDTLEIQIGASISQQQFEVDQDVYLKFETLGYANEFMY : * . * * * * : : : : * * : : * * . * . : * : * : * * . *
Thermus	DPAAPGKYLLDLEKALLQARRAGLREERIYRVGLCTHCAPNLFSHRRDRGRTGRMWGLV
Planococcus	FNSATNKYHIDNQATVKKQCELAGIPSSQILVDSTCTFLNSDGFYSRQDRKCGRHLIFA : * * * : : : * . * * : . : * . * * . : * * : * * : : : :
Thermus	MLPPR
Planococcus	NKNTQ

그림 1-8. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6)과 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase의 alignment 비교

Geobacillus	-----MPDIFQQEARGWLRCG-----APPFAGAVAGLTTKHGGESK--	36
Planococcus	MHSQHRQFNINSTVRLFNAAGLSFFTLNLFHIAVLLFWLILYLKKVMTLKVKFYANNTNF	60
	:* : . : : . : * * . * . : . .	
Geobacillus	-----GPFASLNMGLHVGDRTDVTNNRRRLAEWLAFLERWVCCEQVHGADIQKV	87
Planococcus	VSGITLKELAAPEENMALHACKNPEAVLSNRKSLAEFLDVSLDDFICTQQTHSANFRRV	120
	. . . * . * . : * : * : * : * . * : : * : * . * : : *	
Geobacillus	TKSDRGNGAQDFATAVLGVDGLYTDEAGVLLALCFADCVPITYFAPSAGLVGLAHAGWRG	147
Planococcus	DRHRKGRGAYTVETASDIDGLYTFDPGIVLCSFAADCAPVITHDKTTGLIGVHSGWQG	180
	: : * . * . * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Geobacillus	TAGGIAGHVMRLWQTREHIAPSDIYVAIGPAGPCCYTVDDRVDVSLRPTLPPEPLPWR	207
Planococcus	TVKEITLKFLKHIIISIEQCNPDTLEIQIGASISQQQFEVDQDVYLKF-ETLGYANEFMYF	239
	* . * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Geobacillus	ETSPGQYALDLKEANRLQLLAAGVPNSHIYVSECTSCCEALFFSHRRDRGTTGRMLAFI	267
Planococcus	NSATNKYHIDNQATVKKQCELAGIPSSQILVDSTCT-FLNSDGFYSRQDRKCGRHLIFAI	298
	: : . . : * : * : : : * * : * . * : * : * : * : * : * : *	
Geobacillus	GRREEWT	274
Planococcus	NKNTQ--	303
	. : . :	

그림 1-9. 고온균(*Geobacillus* sp. AR1)과 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase의 alignment 비교

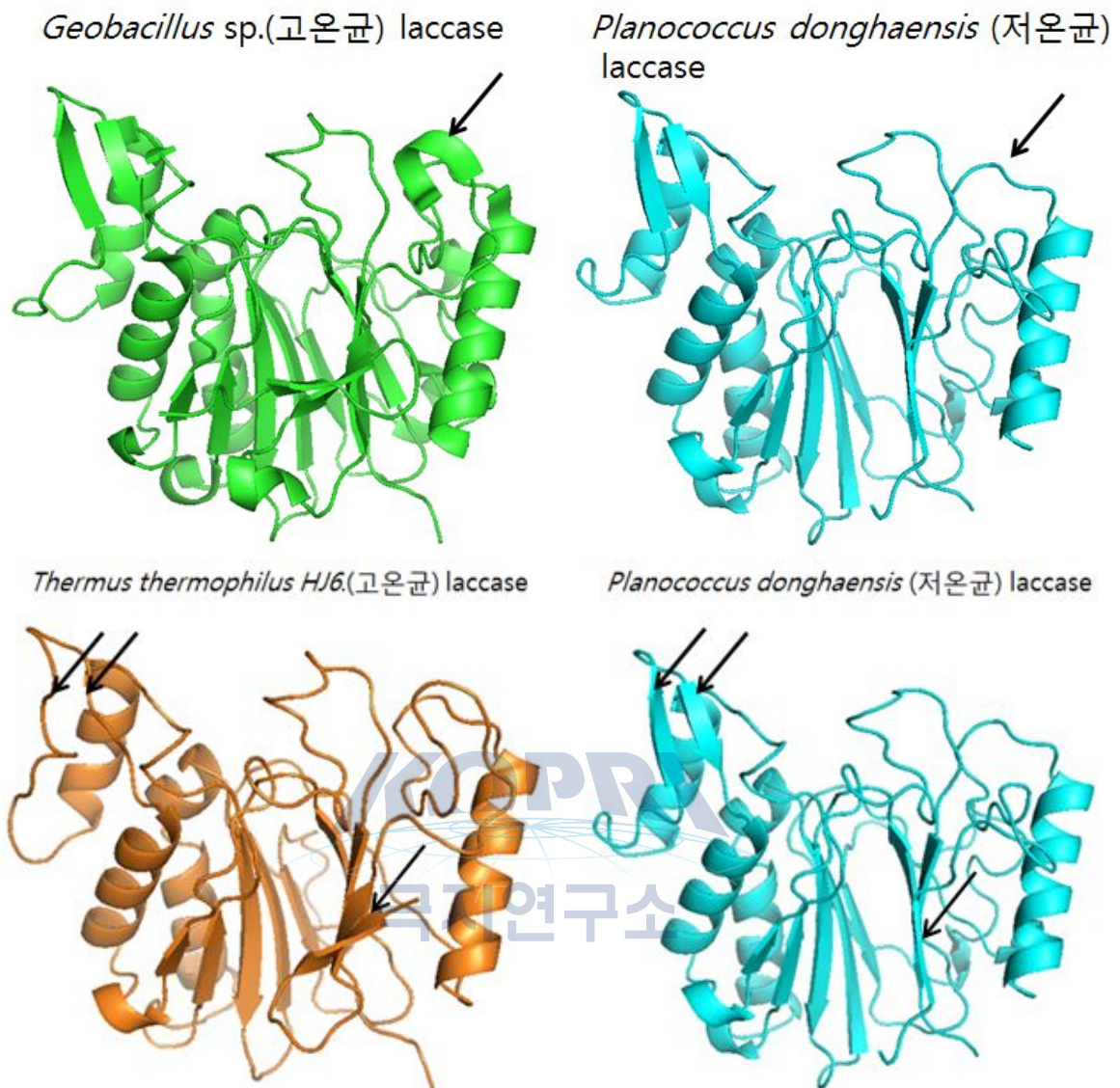


그림 1-10. 고온균(*Geobacillus* sp. AR1, *Thermus thermophilus* HJ6) 및 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase의 3차 구조 비교

제 2 절 저온균(*Planococcus donghaensis*) 및 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 glucose dehydrogenase (GDH)의 대장균 발현 생산

1. 서론

글루코오스 탈수소효소(quinoprotein glucose dehydrogenase, GDH (EC: 1.1.5.2)는 피롤로퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone, PQQ)를 보조소로 사용하는 효소로서 PQQ를 환원시키면서 글루코스 및 다른 알도스를 산화시켜서 알도노- δ -락톤을 생성하는 활성을 나타낸다. 본 효소는 높은 효소 회전수(turnover number)를 가지고, PQQ 보조인자의 전기화학적 재생은 산소분압 및 생산물 억제와 같은 부정적 효과 없이 쉽게 이루어진다. 따라서, 본 효소는 당 관련 바이오센서와 바이오연료전지에 주로 이용되는 유용한 당 산화효소이다.

바이오연료전지(Biofuel cell; BFC)는 효소와 미생물 등이 갖고 있는 생물의 기능을 이용하여 전자공여체인 기질이 가지고 있는 화학에너지를 전기에너지로 전환하는 장치를 의미한다. 구체적으로, 효소반응 또는 미생물의 대사에 의하여 기질이 분해되는 과정에서 발생하는 화학에너지를 전기에너지로 변환시키는 수단과 상기 변환된 전기 에너지를 회수하는 수단을 포함하여, 결과적으로는 미생물을 사용하여 기질로부터 전기를 생산하는 장치를 의미한다. 통상적으로, 바이오연료전지는 환원효소 또는 이를 발현시키는 미생물이 고정된 아노드(anode) 전극, 산화효소 또는 이를 발현시키는 미생물이 고정된 캐소드(cathode) 전극 및 아노드 전극과 캐소드 전극을 연결하는 전선 및 상기 아노드 전극과 캐소드 전극이 담겨진 각각의 반응조로 구성되는데, 각 반응조에 각각의 기질이 포함된 배지가 충전되면, 아노드 전극에 고정된 환원효소 또는 미생물이 분해시켜서, 분해산물로서 수소이온과 전자를 생성시키고, 상기 생성된 전자는 아노드 전극으로부터 캐소드 전극으로 이동하며, 캐소드 전극에 고정된 산화효소는 기질을 산화시키면서, 상기 이동된 전자를 이용하여 배지내의 용존산소를 물의 형태로 전환시켜서 결과적으로는 상기 전선을 통해 연속적으로 전류가 흐르게 된다. 이러한 바이오연료전지의 핵심은 각 전극에 고정된 효소 또는 미생물로서 상기 각 효소 또는 미생물이 기질에 작용하여 전자의 발생 및 소모 효율이 증가할수록 연료전지에서 생산되는 전기의 생산량이 증가하게 된다.

본 연구에서는 바이오연료전지에 사용하는 글루코오스 탈수소효소를 대상으로 하고, 저온균(*Planococcus donghaensis*) 및 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 glucose dehydrogenase (GDH)를 생산하기 위하여 저온균 및 고온균의 GDH를 암호

화하는 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 또한 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 대장균에서 재조합 GDH를 발현 생산 하였다.

2. 재료 및 방법

가. GDH 유전자 클로닝 및 발현 vector 구축

저온균 및 고온균의 염색체는 GeneAll GENEx Genomic kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. GDH 유전자를 클로닝 하기 위하여 계놈 염기서열이 밝혀진 *T. thermophilus* HB27 및 *Planococcus donghaensis*의 GDH 유전자 염기서열을 바탕으로, 각각 개시코돈의 상류와 종결코돈의 하류에 해당하는 두가지 primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR은 Pfu DNA polymerase (INTRON Biotech., Korea)를 사용하여 DNA 단편을 증폭하였고 Topo blunt vector (Enzynomics, Korea)에 클로닝 하였다. 클로닝 된 DNA 단편의 염기서열은 ABI Prism 3700 genetic analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다. 발현벡터 pET-21a에 효소 유전자를 클로닝하기 위하여 ORF를 바탕으로 2가지 primer를 제작하고 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 *Nde* I과 *Xho* I으로 절단 한 후 같은 효소로 절단한 후 pET-21a 벡터에 연결하고 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하였다. pET-21a로 발현한 단백질은 C-말단 쪽에 His-tag가 부착된 융합 단백질의 형태로 생산되었다.

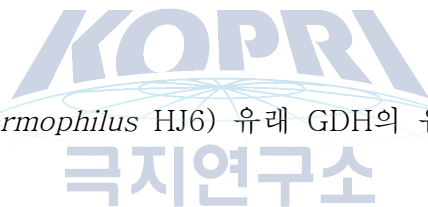
나. GDH의 활성 측정법

표준분석은 다음과 같은 조성(860 μ L 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer; 100 μ L 1 M D-glucose; 10 μ L 6 mM DCIP ($\epsilon_{600} = 21.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); 10 μ L 60 mM PMS; 20 μ L of enzyme sample)으로 혼합한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 DCIP의 흡광도 감소를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 GDH의 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산

저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 GDH를 암호화하는 유전자를 클로닝 하기 위하여, 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *Planococcus donghaensis*의 GDH 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 GDH를 암호화 하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자의 open reading frame (ORF)는 1,011 bp의 길이로 336 아미노산을 암호화하고 있었다(그림 1-2). 예상된 분자량은 36,605 Dalton이고, 등전점은 4.32 이었다. His-tag 유전자를 포함하는 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 *Planococcus donghaensis* GDH 유전자를 클로닝 하고 pET-PdGDH로 명명하였다. 여기서 효소 생산을 위한 숙주 균주로는 *E. coli* SoluBL21(DE3)를 사용하였다. Plasmid pET-PdGDH을 사용하여 *E. coli* SoluBL21(DE3)를 형질전환하였고, 25°C에서 배양하여 흡광도(A₆₀₀) 값이 0.5~0.6에 도달하였을 때 0.3 mM IPTG를 첨가하여 단백질 생산을 유도하였다. 저온균 유래 laccase를 *E. coli* SoluBL21에서 발현한 결과 가용성 획분에서 36.6 kDa의 밴드를 확인하였다(그림 2-2). 그러나 대조구와 비교한 결과 생산량은 많지 않은 것으로 확인되었다.



나. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 GDH의 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산

고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 GDH를 암호화하는 유전자를 클로닝 하기 위하여, 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *Thermus thermophilus* HB27의 GDH 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 GDH를 암호화 하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자의 open reading frame (ORF)는 1,059 bp의 길이로 352 아미노산을 암호화하고 있었다(그림 2-4). 예상된 분자량은 38.9 kDa 이었다. His-tag 유전자를 포함하는 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 *Thermus thermophilus* HJ6 GDH 유전자를 클로닝 하고 pET-TtGDH로 명명하였다. 여기서 효소 생산을 위한 숙주 균주로는 *E. coli* SoluBL21(DE3)를 사용하였다.

```
1 ttattcgttc aatttataca gcttatcaac gtcgtccgct ggtgtaccgc ggccgtcggt
61 attgttggtt ataaagtaaa gcgagtctcc acccgacaat acgtctcgga cagacacaaa
```

121 gccttcaatt gaatctgtca cttcagcatt ttcaggatcc actactttta tggcagtacc
 181 ccgaagtgca gcgacgtata ggagcccatc gtgcatagca atgccgctcg gagcccaagt
 241 ttggtctgag ccggtagtga aaaatggaga ttctaatacca tcttcttttag ccttgccttc
 301 aatgggtggc catccgtaat tattgccttc ttcaataata ttgagttcat cgtagccga
 361 ttgtccgtgt tcagaagcgt acatgggtgtc ttcgtcccaa gtaatacctt gagggtttcg
 421 gtgacctgat gagtaaattt caaatcatc ggaagaattg agctttaaaa ttttgcatt
 481 cacggagcct aagtcttgag caagctctgg agtagaggca tcgccaaccg ttgcaaaaag
 541 tgtaccgtct tcatctaata ctaaacgccc gccgtgatga acattacctg ttggaatgcc
 601 ttctagtaaa acttggcttt ctcgccattc accatcttct aacacaagtg tgataatttt
 661 attgaaatct ttgccgttg cttcgtaaac ataataacca tatgcttctt ggttggtttc
 721 aaaatcttgt tttagacaa accctaaaaa accagcttct gatgcaccgg aaagttatc
 781 cgaaaaacta actggttgat gtgtcactgt accatcttca tcaatataag cgacgttgcc
 841 agttcgctct gaaatataaa actcatcccc caatttggtg attgcccatg gtgtctctag
 901 tcctgtggca atttcttcaa aagggtccgt tgctttttca gggtcgcag ctgagttatt
 961 gcagccggct aaaaacagta acgttagtga agtcattaaa atctttttca c



1 mkkilmtslt llflagcnns aadpekatap feeiatglet pwainklgde fyisertgnv
 61 ayidedgtvt hqpvsfsdki sgaseagflg fvlkqdfetn qeaygyvyve rngkdfnkii
 121 tlvlengewr esqvllegip tgnvhhggrl aldedgtlfa tvgdastpel aqdlgsvngk
 181 ilklssdef eiysghrnp qgitwdedtm yasehgqsan delniieegn nygwptiegk
 241 akedglespf fttgsdqtwa psgiamhdgl lyvaalrgta ikvvdpenae vtdsiegfgr
 301 vrdvlsggds lyfitnntdg rgtpaddvdk lykline

그림 2-1. *Planococcus donghaensis* 유래 GDH의 DNA 염기서열 및 아미노산 서열

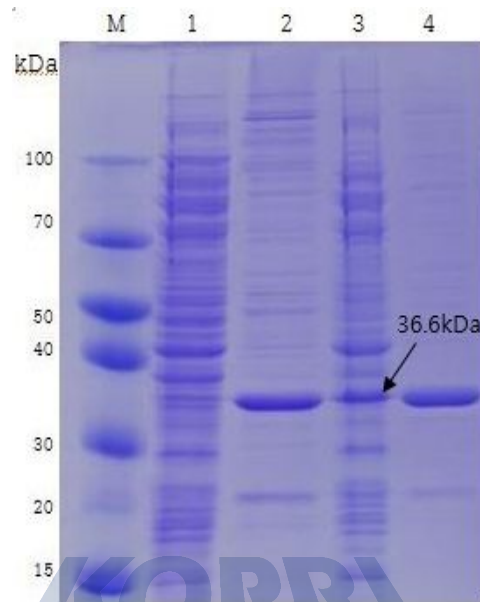


그림 2-2. 저온균 유래 glucose dehydrogenase의 발현 생산. M, 분자량 marker; 1, 대조구 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 상등액; 2, 대조구 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 침전액; 3, 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 상등액; 4, 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 침전액.

Plasmid pET-TtGDH를 사용하여 *E. coli* SoluBL21(DE3)를 형질전환하였고, 25°C에서 배양하여 흡광도(A_{600}) 값이 0.5~0.6에 도달하였을 때 0.3 mM IPTG를 첨가하여 단백질 생산을 유도하였다. 고온균 유래 GDH를 *E. coli* SoluBL21에서 발현한 결

과 가용성 획분에서 38 kDa의 밴드를 확인하였다(그림 2-5). 또한, 그림 2-4에서와 같이, 대장균 균체의 초음파 상등액을 80℃, 20분간 열처리한 후 원심분리하여 얻은 상등액에는 효소의 band가 여전히 남아 있어 본 효소는 내열성이 높은 것으로 판단되었다(그림 2-4).

다. 저온 및 고온성 GDH의 아미노산 서열 비교 분석

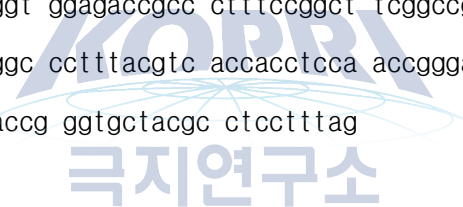
고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 및 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 GDH의 아미노산 서열은 37.6%의 identity를 나타내었고 고온 및 저온에 대한 온도 환경이 50℃ 이상 차이에도 불구하고 비교적 높은 상동성을 나타내었다(그림 2-5).

라. 저온 및 고온성 GDH의 구조 모델링 및 3차 구조 비교

고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 GDH와 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 GDH에 대하여 3차 구조를 비교하기 위하여 단백질 모델링사이트 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)의 프로그램을 사용하여 각각 단백질의 3차 구조를 모델링 하였다. 저온 및 고온성 GDH의 3차 구조는 대부분 β -strand가 반복되는 병풍구조가 원형으로 펼쳐진 형태를 이루고 있고, 특히, 저온성 GDH는 N-말단에 짧은 α -helix구조가 존재하였다. 또한 저온 및 고온성 GDH는 N-말단과 C-말단 부위에서 각각 다른 구조적 형태를 나타내었다(그림 2-6).

```
1 gtggaccgga ggcgctttct cgtggggctt ctcggcctgg gcctcgcccg ggggcagggg
61 ctacgggtgg aggaggtggg ggggggcctc gaggtcccct gggccctggc cttcctgccg
```

121 gacgggggga tgctcatcgc ggagaggccc gggaggatcc ggctctttag ggagggcagg
 181 ctttccacct acgccgagct tcccgtctac caccgggggg agtctgggct tttgggcctc
 241 gccctccacc ctaggtttcc cgaggcgccc tacgtctacg cctaccgcac cgtggcggaa
 301 gggggcctga ggaaccaggt ggtgcgcctg aggcacctgg gggaaagggg ggtcttgga
 361 cgggtgggcc tggacgggat ccccgcccg cccacggcc tccactcggg ggggcgcac
 421 gccttcggcc ccgacgggat gctctacgtg accacggggg aggtctacga gcgggagctc
 481 gccaggacc tcgcctcctt gggggggaag atcctccgcc tcaccccgga aggggagccc
 541 gccccgggaa accccttcct ggggcgaagg ggggcgaggc ccgaggtgta tagcctgggc
 601 caccgcaacc ccaggggcct cgctggcac ccaaagaccg gggagctttt ctccagcgag
 661 cacgggccga gcggggagca gggctatggc cacgacgagg tgaacctgat cgtccccggg
 721 gggaactacg gctggccgag ggtggtggg cgggggaacg acccccggtta ccgggacccc
 781 ctctacttct ggcccaggg cttcccccg gggaacctcg cttcttccg gggggacctc
 841 tacgtggcgg gcctccgggg gcagggcctc ttgaggctcg tcctggaggg ggagaggggc
 901 cgctggcggg ttttgccggg ggagaccgcc ctttccggct tcggccgcct tagggaggtg
 961 caggtgggcc ccgatggggc cttttacgtc accacctcca accgggacgg gaggggccag
 1021 gtgcgccccg gggacgaccg ggtgctacgc ctcctttag



1 mdrrrflvgl lglglargqg lrveevvgg evpwalaflp dggmliaerp grirlfreg
 61 lstyaelpvy hrgesglgl alhprfpeap yvyayrtvae gglnqvvr lrlgergvld
 121 rvvldgipar phglhsggri afgpdgmlyv ttgevyerel aqdlaslggk ilrltpegep
 181 apgnpflgrr garpevyslg hrnpqglawh pktgelfsse hgpsgeqgyg hdevnlivpg
 241 gnygwprvvg rgndpryrdp lyfwpqgfpp gnlafrgdl yvagliqqal lrlvlegerg
 301 rwrvlrveta lsgfgrlrev qvgpdgalyv ttsnrdgrgq vrpqddrvlr ll

그림 2-3. *Thermus thermophilus* HJ6 유래 GDH의 DNA 염기서열 및 아미노산 서열

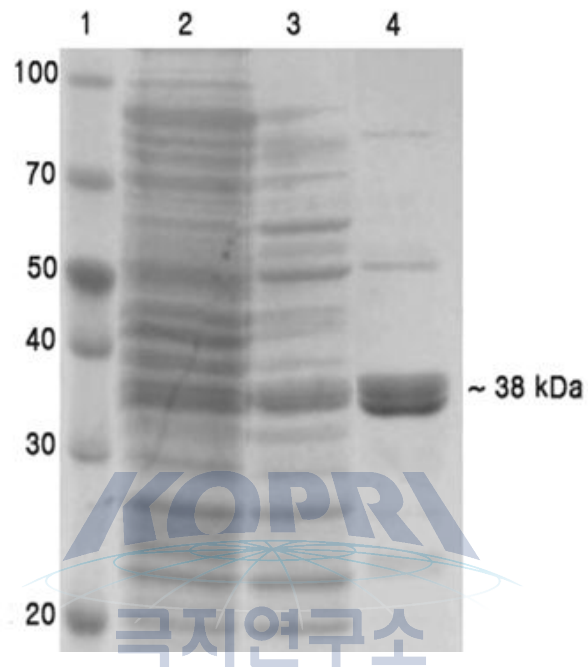


그림 2-4. 고온균 유래 glucose dehydrogenase의 발현 생산. 1, 분자량 marker; 2, 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 상등액; 3, 효소 발현 대장균 균체의 초음파 파쇄 후 침전액; 4. 초음파 상등액의 80℃, 20분간 열처리후 상등액.

Thermus	MDRRRFLVGLLGLGLARGQ-----GLRVEEVVGGLEVPWALAFLPDGGMLIAERPG	51
Planococcus	-MKKILMTSLTLLFLAGCNNSAADPEKATAPFEEIATGLETPWAINKLGDEFFYISERTG	58
	: : : . * * * * : . ** : . *** . *** : * * : * : * * . *	
Thermus	RIRLFREGRLSTYAELPVYHRG----ESGLLGLALHPRFPEAPYVYAYRTVAEGG-LRNQ	106
Planococcus	NVAYIDEDGTVTHQPVSFSDKLSGASEAGFLGFVLKQDFETNQEAYGYVYERNGKDFNK	118
	: : : * . * : : . . : * : * : * : . * : * . * . . * * :	
Thermus	VVRLRHLGERGVLDREVLDGIPARPHGLHSGGRIAFGPDGMLYVTTGEVYERELAQDLAS	166
Planococcus	IITLVLENGEWRESQVLLEGIPITG--NVHHGGRLALDEDTLGFATVGDASTPELAQDLGS	176
	: : * . . . : * : * : * : . : * * * : * : . * * : * . * : . * * * * . *	
Thermus	LGGKILRLTPEGEPAPGNPFLGRRGARPEVYSLGHRNPQGLAWHPKTGELFSSEHGPGSGE	226
Planococcus	VNGKILKLNSSDE-----FEIYSSGHRNPQGITWDEDT--MYASEHGQSAN	220
	: . * * * : * . . . * * : * * * * * : : * . * : : * * * * * :	
Thermus	QGYGHDEVNLI VPGGNYGWPRVVGRGNDPRYRDPLYFWP--QGFPPGNLAFFRGDLYVAG	284
Planococcus	-----DELNIIEEGNNGWPTIEGKAKEDGLESPPFTTGSDQTWAPSGIAMHDGLLYVAA	275
	* * : * * * . * * * * : * : : . * : : * : . * . . : * : . * * * * .	
Thermus	LRGQALLRLVLEGERGRWRVLRVETALSGFGRLREVQVGPDGALYVTTSNRDGRGQVRPG	344
Planococcus	LRGTAIKVVDPEN-----AEVTDSIEGFGVRVDVLSGGD-SLYFITNNTDGRGTPADD	327
	* * * * : : * . * : : * * * : * * * * * * * : * * . * * * * * .	
Thermus	DDRVLRL--	352
Planococcus	VDKLYKLNE	336
	* : : : *	

그림 2-5. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6)과 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 GDH의 alignment 비교

Thermus thermophilus HJ6 (고온균) GDH *Planococcus donghaensis* (저온균) GDH

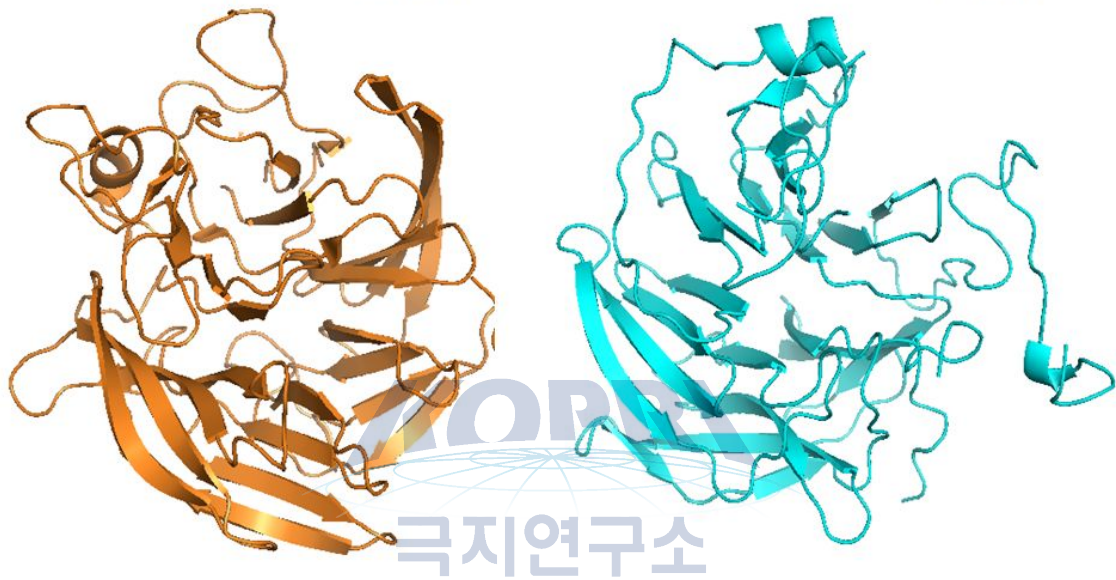


그림 2-6. 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 및 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 GDH의 3차 구조 비교

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발목표 및 달성도

1. 연구성과목표

: 저온 및 고온성 산화환원효소의 특성 규명 및 분자구조 분석

2. 세부내용

가. 저온 및 고온성 산화환원효소의 클로닝 및 발현 생산

- 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산
- 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 glucose dehydrogenase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산
- 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 laccase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산
- 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 glucose dehydrogenase 유전자 클로닝 및 대장균 발현 생산

나. 산화환원효소의 생화학적 특성 규명 및 분자 구조 분석

- 고온균 유래 laccase의 효소 활성 및 기질 특이성을 포함한 생화학적 특성을 규명함
- 저온 및 고온성 효소분자의 구조 모델링 및 분자구조를 비교 분석함
-

3. 평가의 착안점에 입각한 달성도

- 저온 및 고온성 산화환원효소의 유전자의 클로닝 및 발현생산 4건 이상 달성함(달성도 : 100%)
- 산화환원효소의 생화학적 특성 규명 1건 및 4가지 산화환원효소의 분자 구조 비교 분석함 (달성도 : 100%)

제 2 절 대외기여도

1. 학술적 기여도

- 저온 및 고온성 산화환원효소의 특성 융합에 대한 최초 방법 제시 및 관련 연구의 활성화
- 활성이 우수한 효소를 탐색하는 고전적 방법 대신 목적에 따라 용이하게 효소 활성을 조절할 수 있는 구조인자를 규명하면 생물전환 관련 기초 및 응용연구를 위한 원천 기반기술이 확보됨
- In vitro coevolution 기술은 핵심적 원천 융합 학문으로서 다른 효소 연구에도 광범위하게 적용될 수 있음
- 저온 및 고온성 효소의 특이적인 구조를 확보하고 분석함으로써 자연계에서 각 효소 단백질이 어떤 진화과정을 거쳐 저온 및 고온에 적응하게 되었는지에 대한 생물 진화과정의 기초적 정보를 제공하게 될 것임
- 본 연구에서 In vitro coevolution을 통하여 안정성이 강화된 저온성 산화환원효소를 개발하면 implantable biofuel cell에 적용하고 이것을 남극생물에 이식하여 남극생물의 생태 연구에 활용할 수 있음

2. 경제적 기여도

- 산화환원효소의 고활성화 및 안정화에 대한 조절 기반기술이 확보되면 산업적으로 다양한 화합물의 환경 친화적 및 경제적 생산이 가능하게 됨
- Laccase의 고효율화를 통하여 염료탈색, 펄프표백, 폴리머 합성, 바이오센서, 바이오연료전지, 환경정화 등에 활용하면 높은 경제적 수익을 창출할 수 있음

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

- 대장균에서 발현 생산된 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 laccase의 생화학적 특성 분석이 필요함
- 대장균에서 발현 생산된 저온균 및 고온균 유래 glucose dehydrogenase의 생화학적 특성 분석이 필요함
- DNA shuffling 및 point mutation에 의한 산화환원효소의 변이체 확보가 필요함
- 산화환원효소의 활성이 향상된 변이체 확보를 위하여 High throughput screening 기술 확보가 필요함
- 변이체의 아미노산 서열 및 구조 분석을 통하여 산화환원효소의 고활성화 및 온도 감수성에 대한 단백질 구조 기반 원리 규명이 필요함
- 저온성 효소의 온도 의존성 작용 기작의 규명이 필요함
- 저온성 산화환원효소의 바이오연료전지에서의 활용가치 발굴이 필요함

제 2 절 타연구에의 응용

In vitro coevolution에 의한 효소 설계 기술은 앞으로 새로운 산업용 효소 개발, 단백질 의약품 개발, white biotechnology, 합성 생물학 등의 분야에서 광범위하게 활용되어 생명공학의 산업화에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한, in vitro coevolution에 의한 활성 및 기질특이성 조절의 원천기술이 확보되면 새로운 균주의 선별 없이도 산업적으로 중요한 화합물의 환경 친화적 생산이 가능하게 된다. 이를 통해 고부가가치 산화환원효소 관련 화합물의 신개념 산업적 생산법을 제시할 뿐만 아니라 유사 효소 산업에도 적용할 수 있어 큰 파급 효과를 가질 것으로 기대한다.

제 6 장 참고문헌

- Alexandre, G. and I. B. Zhulin. (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* 18: 41-42.
- Arias, M. E., M. Arenas, J. Rodríguez, J. Soliveri, A. S. Ball, and M. Hernández. (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1953-1958.
- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases - Occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215-242.
- Claus, H., G. Faber, and H. König. (2002) Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 672-678.
- Dittmer, N. T., R. J. Suderman, H. Jiang, Y. C. Zhu, M. J. Gorman, K. J. Kramer, and M. R. Kanost. (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 29-41.
- Feller, G. (2003) Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 648-662.
- Feller, G., Gerday C. (2003) Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 200-208.
- Fernandes, A. T., C. M. Soares, M. M. Pereira, R. Huber, G. Grass, and L. O. Martins. (2007) A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEBS J.* 274: 2683-2694.
- Georlette, D., Damien, B., Blaise, V., Depiereux, E., Uversky, V. N., Gerday, C. and Feller, G. (2003) Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *J Biol. Chem.* 278: 37015-37023.
- Huttermann, A., C. Mai, and A. Kharazipour. (2001) Modification of lignin for the

- production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 387–394.
- Jaenicke, R. (1981) Enzymes under extremes of physical conditions. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10: 1–67.
- Liu X, Gillespie M, Ozel AD, Dikici E, Daunert S, Bachas LG. (2011) Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 399: 361–366.
- Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones, and A. O. Henriques. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277: 18849–18859.
- Mayer, A. M. (1987) Polyphenol oxidases in plants - Recent progress. *Phytochemistry* 26: 11–20.
- McCullum, E. O., Williams, B. A., Zhang, J. and Chaput, J. C. (2010) Random mutagenesis by error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.* 634: 103–109.
- Miyazaki, K. (2005) A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9: 415–25.
- Murugesan, K. (2003) Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 1239–1248.
- Palonen, H. and L. Viikari. (2004) Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 550–557.
- Peter, M. G. and U. Wollenberger. (1997) Phenol-oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. *EXS.* 80: 63–82.
- Smalas, A. O., Leiros, H. K., Os, V. and Willassen, N. P. (2000) Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1–57.
- Stemmer, W. P. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature.* 370: 389–3891.
- Thurston, C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19–26.
- Wu, S., Acevedo, J. P. and Reetz, M. T. (2010) Induced allostery in the directed

evolution of an enantioselective Baeyer–Villiger monooxygenase.
Proceedings of the National Academy of Sciences. 2107: 2775–2780.





1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.