

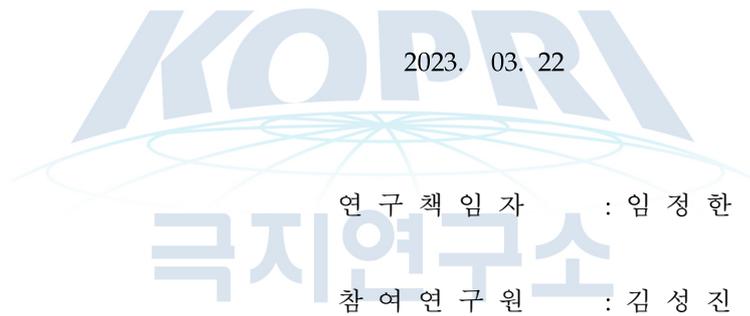
표 지(주요사업)

	<p>P E 2 1 5 0 0</p> <p>극지유래 신규 산업용 효소 상용화 연구</p> <p>한국해양연구원 부설극지연구소</p>	<p>BSPE21500-048-11</p> <p>극지 유래 신규 산업용 효소 상용화 연구</p> <p>A study on the Commercial Industrial Enzymes from Polar Origins</p> <p>2023. 03. 22</p> <p>한국해양과학기술원 부설극지연구소</p>
--	--	---

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 유래 신규 산업용 효소 상용화 연구” 에 관한 최종 보고서로 제출합니다.



“ : 김민주

“ : 박하주

“ : 원은영

보고서 초록

과제관리번호	PE21500	해당단계 연구기간	2021.09.01. ~ 2023.02.28	단계 구분	1/ 1
연구사업명	중 사업명	정책·지원과제			
	세부사업명	-			
연구과제명	중 과제명	-			
	세부(단위)과제명	극지 유래 신규 산업용 효소 상용화 연구 (A study on the Commercial Industrial Enzymes from Polar Origins)			
연구책임자	임정한	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부 : 3 명 외부 : 2 명	해당단계 연구비	정부 : 240,000 천원 기업 : 천원 계 : 240,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소 / 생명과학연구본부		참여기업명	(주)크라이오텍	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :	계 : 240,000 천원		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Pseudalteromonas arctica</i> PAMC 21717 유래 저온성 단백질분해효소인 R-P66을 대량 생산하는 3 종의 재조합 대장균 유가식 발효 조건을 확립함 ○ 2 종의 산소 사용 유가식 발효와 1 종의 산소 미사용 발효에서 재조합 대장균의 성장(O.D.600)은 275 ~ 281, 213 ~ 242 및 156 ~ 161으로 3 종의 고밀도 배양에서 높은 발현율로 R-P66 I.B.를 생산함 ○ 30 L, 500 L 및 5,000 L의 산업 생산 발효기에서 재조합 대장균의 성장 및 재조합 단백질 생산을 성공적으로 재현함 ○ 산업 발효 재조합 대장균에서 생산된 R-P66 I.B.의 추출 및 unfolding 방법을 최적화함 ○ 기존의 방법과 비교하여 활성형 R-P66을 84배 이상 농축 생산 가능한 방법을 확립하고 3,000 L 발효로 약 219 kg 이상의 R-P66 I.B. 생산과 R-P66 I.B.으로부터 약 7.4 kg 이상의 R-P66을 생산할 수 있음을 확인함 ○ R-P66의 농축법을 결정하였고, 농축 R-P66을 30℃, 28일 이상 보존할 수 있는 9종의 보존제 조성을 제작함 ○ R-P66의 의류 및 주방 세제와 분자진단 산업 활용 가능성에 대한 기초 근거를 마련함 ○ R-P66의 의류 및 주방 세제와 분자진단 산업을 포함한 다양한 산업 진입을 위한 생산 증대 및 실증에 대한 추후 연구와 신규 저온성 효소 발굴의 필요성을 제기함 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	저온성 효소, 단백질분해효소, 발효, 리폴딩, 세정제, 분자진단			
	영 어	Cold-adapted Enzyme, Protease, Fermentation, Detergent, Molecular diagnosis			

요 약 문

I. 제 목

“극저 유래 신규 산업용 효소 상용화 연구”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계 효소 시장은 2021년 124억 6,000만 달러 규모였으며, 단백질분해효소는 산업효소의 약 56%를 차지하고 있다. 단백질분해효소는 세계 산업, 감염 진단 및 R&D, 가죽 가공, 식품 산업, 육류 가공, 치즈 제조, 제지 및 펄프, 화학 산업, 생물학적 환경정화 등 수많은 분야에서 상용화되었으나, 현재까지의 단백질분해효소는 중·고온성 효소들이다.

전전 세계적으로 CO₂ 배출 절감 및 친환경 산업으로의 산업 구조 전환 필요성이 증가하고 있어 저온성 효소 개발이 필요하다. 극저의 저온적용 미생물이 생산하는 저온성 효소는 낮은 온도를 요구하는 산업공정에서 효율적으로 활용될 수 있으며, 세제 및 식품 가공과 같은 저온에서 반응이 수행되어야 하는 산업 분야에서 특히 저온성 단백질분해효소는 필요하다. 현재까지는 산업에서 사용되고 있는 저온성 단백질분해 효소가 없으므로, 이 효소에 대한 상용화 연구가 필요하다.

저온성 단백질분해효소의 산업 진입은 21세기 국가 성장동력인 생물공학산업의 새로운 패러다임을 제시할 수 있을 것이다. 극저연구소에서는 *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717 유래의 저온성 단백질분해효소 R-P66이 기존 산업 효소와 다른 산업적 장점을 보유한 것을 확인하였고, 기초적인 R-P66 생산법을 확립하였다. 다양한 산업에 진입이 가능한 R-P66을 상용화하기 위해, 본 연구과제는 다음과 같은 연구목적을 설정하였다. “1) 상용화 대량생산 시스템 규명 / 2) 상용화 저온효소 보존제 규명 / 3) 3건 이상의 저온효소 활용 검증”

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 저온성 단백질분해효소 R-P66의 대량생산 시스템을 규명하고, 상대적으로 취약한 저온성 효소의 온도 안정성 문제를 해결하고, 생산된 R-P66의 산업적 유용성 연구를 연구개발 목표로 하고 있다. 각 연구개발 목표의 세부 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

- 1) 상용화 대량생산 시스템 규명 : 개량된 대장균 생산시스템 구축, 생산발효 조건 최적화 및 3,000 L 급 발효 재현과 I.B. 추출 및 unfolding/refolding의 R-P66 활

성화 방법 개선

- 2) 상용화 저온효소 보존제 규명 : 30 또는 37°C, 28일의 온도 스트레스에서 75% 이상의 효소 활성 유지 보존제 탐색
- 3) 저온효소 활용 검증 : 현재의 상용화 효소가 사용되는 진단키트, 의료용 세척제, 주방 또는 의류용 세제로의 대체 활용 검증

IV. 연구개발결과

- tac-promoter와 2 개의 R-P66 유전자가 삽입된 발현 벡터를 함유한 *E. coli* BL21 (DE3) 균주 제작함
- *Pseudalteromonas arctica* PAMC 21717 유래 저온성 단백질분해효소인 R-P66을 대량 생산하기 위해, 3 종의 재조합 대장균 유가식 발효 조건을 확립함
- 3 종의 재조합 대장균 유가식 발효 조건 중, 2 종은 산소가 요구되는 발효로 재조합 대장균의 최대 성장 O.D.600nm는 275-281과 213-242, 1 종은 산소를 요구하지 않는 발효로 최대 성장 O.D.600nm는 156-161을 기록하여 R-P66 생산을 위한 재조합 대장균의 고밀도 배양을 확인함
- 30 L, 500 L 및 5,000 L의 산업 생산 발효기를 통해 재조합 대장균의 산소 무공급 고밀도 배양으로 최대 성장 O.D.600nm는 100 ~ 140의 성장 재현을 확인함
- 재조합 대장균으로부터 R-P66 I.B. 회수 및 R-P66 I.B.의 unfolding 방법에 대한 효율적 방법을 제시하였고, 기존 방법 대비 최대 84 배 이상 농축된 활성형 R-P66 생산법을 제시하여 3,000 L 산업 생산 발효로 약 1.7 ~ 3.0 g/L 및 7.4 kg의 R-P66을 생산할 수 있는 자료를 확보함
- R-P66을 30 mg/mL 이상의 농도로 농축하는 조건과 농축 R-P66의 30°C, 28 일 이상 보존할 수 있는 조건을 실증 확립함
- R-P66은 경쟁효소인 Novozymes사의 Savinase[®] subtilisin 보다 blood/milk/ink 및 egg yolk 오염포에 대한 뛰어난 세척력을 보여 의류 및 주방 세제 첨가물로 사용될 수 있음
- R-P66은 DNA 및 RNA 추출에 사용가능하며, 비경제성의 proteinase K 보다 분자진단의 direct qRT-PCR에 적합함
- R-P66의 안정적 산업 진입을 위해 R-P66 생산 및 보존 방법에 대한 지속적인 개량과 R-P66의 기능을 최대로 발휘할 수 있는 제품 구성 연구가 필요함

V. 연구개발결과의 활용계획

- 저온성 효소 R-P66을 대량생산하고, 의류 및 주방 세척제 및 분자진단 활용의 제품 구성을 확립하여 의류 및 주방 세척제 및 분자진단 시장 진입
- 의류 및 주방 세척제 및 분자진단 시장 외 R-P66 활용 가능 시장 탐색, 연구 및 진입
- 차세대 바이오신소재로서 저온성 효소의 활용성 제시 및 후속 저온성 효소 발굴



목 차

제 1 장 서론	12
제 1 절 연구개발의 목적	12
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위	13
1. 기술적 측면	13
2. 경제·산업적 측면	13
3. 과학적 측면	14
4. 사회·문화적 측면	14
5. 연구 범위	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1 절 연구개발에 대한 일반적 서론	21
1. 단백질분해효소(Protease)	21
2. Protease의 대표산업	25
3. 대장균 고밀도 배양과 inclusion body	29
4. Aim	30
제 2 절 연구방법	31
1. R-P66 생산 균주, 효소 활성화 및 효소 활성 측정	31
2. R-P66 생산을 위한 발효	32
3. R-P66 I.B. 추출	34
4. 활성형 R-P66 생산	35
5. R-P66 농축	38
6. 보존제 탐색	38
7. R-P66의 산업 적용	40
제 3 절 연구 결과	43
1. R-P66 생산을 위한 발효	43
2. R-P66 I.B. 추출	60
3. 활성형 R-P66 생산	64
4. R-P66 농축	78

5. 보존제 탐색	82
6. R-P66의 산업 적용	86
제 4 절 고찰	95
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	96
제 1 절 연구목표 및 연구내용	96
1. 연구개발의 최종 목표	96
2. 연구개발 목표 및 내용	96
제 2 절 연구목표 및 평가착안점에 근거한 목표 달성도	97
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	98
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	100
제 7 장 참고문헌	102



그림 차례

그림 1-2-1. R-P66의 구조와 R-P66 생산법	15
그림 1-2-2. 연구개발 추진체계	16
그림 1-2-3. 연구개발목표별 핵심내용	16
그림 3-1-1. 전 세계 세탁세제 시장 규모	25
그림 3-1-2. 전 세계 의료기기 세정제 시장 규모	27
그림 3-1-3. 전 세계 동물 사료 시장 규모	28
그림 3-1-4. 이전에 확립된 R-P66 생산법	30
그림 3-2-1. 한국생명공학연구원의 Feeding 및 Seed Tank와 5,000 L 발효기	33
그림 3-3-1. 유가식 발효 ①의 테스트 발효	43
그림 3-3-2. 발효 동안의 pH, DO, air 및 agitation speed	44
그림 3-3-3. Thiamine-HCl 공급에 따른 재조합 <i>E. coli</i> 의 성장	44
그림 3-3-4. 산소 공급에 의한 재조합 <i>E. coli</i> 의 성장	45
그림 3-3-5. Yeast extract 공급에 의한 재조합 <i>E. coli</i> 성장	46
그림 3-3-6. 유가식 발효 ①의 최적화	47
그림 3-3-7. 최적화한 유가식 발효 ①에서의 R-P66 I.B. 생산	47
그림 3-3-8. 유가식 발효 ②의 테스트 발효에서의 pH, O ₂ , DO, air 및 agitation speed 변화	48
그림 3-3-9. 유가식 발효 ② 테스트 발효에서의 재조합 대장균 성장	48
그림 3-3-10. 유가식 발효 ② 테스트 발효에서의 R-P66 I.B. 생산	49
그림 3-3-11. MgSO ₄ ·7H ₂ O 조절 유가식 발효 ②에서의 pH, O ₂ , DO, air, feeding speed 및 agitation speed 변화	50
그림 3-3-12. MgSO ₄ 또는 feeding 속도를 조절한 재조합 <i>E. coli</i> 발효	50
그림 3-3-13. MgSO ₄ 또는 feeding 속도를 조절한 발효에서의 R-P66 I.B. 생산	51
그림 3-3-14. Feeding speed 조절 발효에서의 pH, O ₂ , DO, air 및 agitation speed 변화	51
그림 3-3-15. Feeding speed 조절 발효에서의 재조합 <i>E. coli</i> 성장	52
그림 3-3-16. Feeding speed 조절에 의해 30 g/L yeast extract가 제공된 발효에서의 R-P66 I.B. 생산	52
그림 3-3-17. 최적화한 유가식 발효 ②에서의 pH, O ₂ , DO, air, feeding speed 및 agitation speed	53
그림 3-3-18. 최적화한 유가식 발효 ②에서의 재조합 대장균 성장	53
그림 3-3-19. 최적화한 유가식 발효 ②에서의 R-P66 I.B. 생산	54
그림 3-3-20. 유가식 발효 ③ 테스트 발효의 pH, air 및 agitation speed	54

그림 3-3-21. 유가식 발효 ③ 테스트 발효에서의 재조합 대장균 성장 및 다양한 성장 시점에서의 IPTG induction	55
그림 3-3-22. 유가식 발효 ③ 테스트 발효에서의 R-P66 I.B. 생산	55
그림 3-3-23. 고함량 glucose에서 feeding 조절에 따른 재조합 대장균의 성장	56
그림 3-3-24. 220413 batch의 DO, pH 및 agitation speed	56
그림 3-3-25. 고함량 glucose에서 feeding 조절한 발효에서의 R-P66 I.B 생산	56
그림 3-3-26. 220726 및 220914 batch의 pH, DO, air 및 agitation speed	57
그림 3-3-27. 220726 및 220914 batch의 재조합 대장균 성장과 feeding 속도	57
그림 3-3-28. 220726 및 220914 batch의 R-P66 I.B. 생산	58
그림 3-3-29. 30, 500 및 5,000 L 발효기 사용 발효에서의 air, agitaion speed, DO, pH 및 압력 ...	59
그림 3-3-30. 30, 500 및 5,000 L 발효기에서 재조합 대장균의 성장	59
그림 3-3-31. 30, 500 및 5,000 L 발효기에서의 R-P66 I.B. 생산	60
그림 3-3-32. Nano disperser를 이용한 재조합 대장균 파쇄 및 R-P66 I.B. 회수	61
그림 3-3-33. 세포 파쇄 횟수에 따른 물성 변화 및 회수 R-P66 I.B.	61
그림 3-3-34. Chamber type과 파쇄 압력에 따른 R-P66 I.B. 추출	62
그림 3-3-35. R-P66 I.B. 회수에서의 washing 영향	63
그림 3-3-36. 산업 발효로부터 R-P66 I.B. 회수	64
그림 3-3-37. Urea 농도에 따른 R-P66 I.B.의 가용화	64
그림 3-3-38. R-P66 I.B. 농도를 달리한 가용액 내 단백질	65
그림 3-3-39. R-P66 I.B.의 cell debris 및 unknown 단백질 분석	66
그림 3-3-40. R-P66 생산을 위한 buffer 선별	67
그림 3-3-41. Unfolded R-P66의 urea 제거 및 refolding	68
그림 3-3-42. Unfolded R-P66 보관 가능 방법 확인	68
그림 3-3-43. 산업 발효 R-P66 I.B. unfolding	69
그림 3-3-44. R-P66 refolding 용액 내 첨가물들의 refolding 영향	70
그림 3-3-45. Refolding 사용 buffer 선별	71
그림 3-3-46. 보존제 후보 물질에 의한 R-P66의 auto-lysis 방지 효과	72
그림 3-3-47. 낮은 urea 농도에서의 refolding	73
그림 3-3-48. Urea 희석 용액 조절 후 각 urea 농도의 unfolded R-P66의 refolding 활성 ...	74
그림 3-3-49. 0.4 M urea의 unfolded R-P66의 고농도 refolding	74
그림 3-3-50. TFF filter system을 이용한 urea 제거 및 refolding	75
그림 3-3-51. NaHCO ₃ 에서의 urea 제거 효율	76
그림 3-3-52. NaHCO ₃ 를 첨가한 urea 제거 refolding	77

그림 3-3-53. CaCl ₂ 첨가 또는 무첨가에서의 urea 제거 refolding	77
그림 3-3-54. Ammonium sulfate를 이용한 R-P66 농축	79
그림 3-3-55. 동결건조를 통한 R-P66 농축	79
그림 3-3-56. Sucrose를 첨가한 R-P66 동결건조	80
그림 3-3-57. Ca ²⁺ 공급에 의한 R-P66 활성 회복	81
그림 3-3-58. 동결건조와 filter 농축의 R-P66	81
그림 3-3-59. Plackett Burman Design 시험 결과	82
그림 3-3-60. 중심합성 계획법 시험 결과	83
그림 3-3-61. Box-Behnken Design 시험 결과-1	83
그림 3-3-62. Box-Behnken Design 시험 결과-2	84
그림 3-3-63. Box-Behnken Design 시험군의 28일 보존 효과	84
그림 3-3-64. 보존제 구성 물질들의 개별적 보존 효과 추정	85
그림 3-3-65. 9 종의 보존제에서의 R-P66 열 안정성	86
그림 3-3-66. Blood/Milk/Ink 및 Egg yolk 오염포 세척력-1	87
그림 3-3-67. Blood/Milk/Ink 및 Egg yolk 오염포 세척력-2	88
그림 3-3-68. Mouse liver tissue에 대한 gDNA 추출	88
그림 3-3-69. 미국산 소고기 lysate gDNA 추출	89
그림 3-3-70. Kit 구성물질에 대한 R-P66과 PK의 안정성	90
그림 3-3-71. Mouse mammalian 세포 RNA 추출	90
그림 3-3-72. <i>E. coli</i> RNA 추출	91
그림 3-3-73. EDTA에 의한 R-P66의 활성 손실	91
그림 3-3-74. Ethanol에 의한 PK와 R-P66의 활성 변화 및 PK와 R-P66의 qRT-PCR 효소 분해능	93
그림 3-3-75. PK 또는 R-P66 존재하에서의 Two step qRT-PCR	93
그림 3-3-76. PK 또는 R-P66 존재하에서의 One step qRT-PCR	94

표 차례

표 1-1-1. 연구개발 목표, 내용 및 범위	12
표 1-2-1 연구개발 결과에 대한 평가범위	17
표 2-1-1 Nozozymes사의 protease 단독 제품	19
표 3-1-1 상용화된 alkaline protease	24
표 3-2-1 R-P66 보존제 탐색을 위한 Minitab design	39
표 3-2-2 R-P66 보존제 후보물 조성	40
표 3-2-3 효소액 조성	41
표 3-3-1 R-P66를 위한 후보 보존제 조성	85



제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구과제(극지 유래 신규 산업용 효소 상용화 연구)는 극지연구소 정책지원과제로서 극지 고유생물 유래 산업용 저온성 효소 상용화를 위한 생산공정 시스템 규명 및 활용 검증을 목표로 삼고 있다. 이를 위해 상용화 후보 효소인 남극 해양의 *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717 유래 저온성 단백질분해효소 R-P66의 생산공정 시스템 규명 및 활용 검증을 수행하고자 하며, 연구 수행 전체 기간 동안의 정성적 목표로서, 1) 공정 생산균주 개발, 3,000 L 급 발효생산 및 refolding 조건 확립, 2) 생산 저온성 효소의 30 또는 37°C 28일 동안 75% 이상 활성 유지 안정화제 탐색, 3) 세제, 의료용 세정제 및 진단키트용 활용검증 등으로 설정하였다(표 1-1-1).

표 1-1-1 연구개발 목표, 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용	연구범위
1차년도 (2021)	상용화 대량생산 시스템 규명	○ 최적 대량생산 공정 시스템 규명	○ 공정 생산균주 개발, 3,000L 급 발효 생산 및 refolding 생산조건 확립
	상용화 저온효소 보존제 규명	○ 저온효소 상용화 보존제 조 건 개발	○ 30 또는 37°C 28일 효소 불 안정화 조건에서의 75% 이 상 효소 안정화제 탐색
	저온효소 활용 검증	○ 진단키트용(diagnostic kit for the detection of the infection of the virus) 단 백질 분해효소 활용 검증 ○ 의료용 세척제(cleansing solutions for medical use) 첨가용 단백질 분해효소 활 용 검증 ○ 의류용 세제(detergent for clothes) 첨가용 단백질 분 해효소 활용 검증	○ Proteinase K 또는 subtilisin 을 대체할 수 있는 세제, 주 방 및 의료용 세정제 또는 진단키트용으로의 활용 검증

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 기술적 측면

극한 환경 조건에서 서식하는 극한 미생물(extremophiles)은 극한의 환경 조건에서 안정적으로 서식할 수 있는 특유의 생존전략을 보유하고 있다. 극지의 저온 특수 환경에 서식하는 생물은 형질, 유전체의 구조나 생화학적 물질대사 과정이 다른 생물과는 현저하게 다른 특이한 점이 많으며, 기존의 개념과는 상이한 새로운 생물 소재와 유용 물질을 생산할 가능성이 매우 높아 우수한 개발 대상으로 여겨진다.

극지의 저온 적응 미생물은 저온성 효소(cold-adapted enzyme)를 합성하여 저온 환경 생존이 가능하며, 저온성 효소는 열 안정성의 동족 효소에 비해 높은 수준의 유연성을 부여하는 다양한 구조적 특징으로 발전해 왔다. 저온성 효소는 저온 요구의 산업공정에서 생체 촉매제로서 많은 관심을 받고 있다. 저온성 효소를 이용한 저온의 효소반응은 상온 또는 고온에서 불안정한 물질을 기질로 사용할 수 있도록 도와준다.

2. 경제·산업적 측면

21세기 국가경쟁력의 핵심 사업 중 하나로 바이오산업이 꼽히며, 바이오산업은 급증하는 바이오 특허에 따라 독점적 시장의 특징이 있다. 산업용 효소의 세계 시장은 2021년 66억 달러 규모였으며, 단백질분해효소는 세계 효소 시장의 65% 이상을 차지하고 있다. 단백질분해효소는 세제 산업, 감염 진단 및 R&D, 가죽 가공, 식품 산업, 육류 가공, 치즈 제조, 제지 및 펄프, 화학 산업, 생물학적 환경정화 등에서 사용되고 있으며, 현재까지의 산업용 단백질분해효소는 중·고온성 효소들이다.

저온성 효소의 연간 시장 규모는 약 2억 5천만 달러로, 효소의 다양한 기능을 고려할 때 저온성 효소의 잠재적 가치는 크며, 특정 활성, 낮은 안정성 및 특이성 수준에서 상당한 산업적 이점을 제공한다. 화학 공정에서 저온성 효소를 사용하면 에너지를 절약할 수 있을 뿐만 아니라 저온에서 화학 반응을 수행하여 고온에서 발생할 수 있는 화학적 부반응을 방지할 수 있다. 저온성 효소의 열 불안정성 때문에 적당한 온도에서 급속하게 비활성화하는 효소의 특징은 식품 산업, 정밀 화학 합성 및 분자생물학 응용 분야에 유리한 작용을 한다.

산업용 효소로서의 저온성 단백질분해효소의 개발 사례는 거의 없으며, 세제 및 식품 가공 같은 저온에서 반응이 수행되어야 하는 산업 분야에서 저온성 단백질분해효소는 시간과 에너지 소비를 줄일 수 있게 하는 효율적 공정 수행 물질이다.

효소를 사용하는 공정은 화학 공정과 달리 지속 가능하고 친환경적이기 때문에, 산업 화학

촉매는 효소 촉매로 대체되고 있다. 효소 시장의 확장 가속화는 높거나 낮은 pH, 온도 및 염도 등의 가혹한 조건에서 수행되는 공정에서의 효소 사용과 관련되기 때문에, 극한 조건에서 사용할 수 있는 새로운 생체 촉매제에 대한 연구가 요구되고 있다.

3. 과학적 측면

영구적으로 추운 서식지에 적용된 유기체에 의하여 생산되는 저온성 효소는 낮은 온도에서 높은 촉매 속도를 보유하여 저온 환경에서 생존하는 저온적용 생물에게 적절한 생존력을 부여한다.

저온적용 종의 효소가 물의 빙점 근처에서 어떻게 기능할 수 있는지에 대한 질문은 생화학 및 구조 생물학의 근본적 연구 주제로 극지 및 심해 어류와 같이 원핵생물과 진핵생물을 모두 포함하는 생물종은 저온(0°C 부근)에서 상당한 촉매 활성을 갖는 효소를 진화시켰다. 저온성 효소의 활성 부위 주변의 높은 유연성은 낮은 활성화 엔탈피, 낮은 기질 친화성 및 저온에서의 높은 활성을 제공하며 동시에, 열 불안정성을 제공한다. 뛰어난 저온활성 효소의 발굴, 구조적 특성 및 작용기작 규명과 효소 엔지니어링 기술을 통해 저온성 효소의 상용화 개발이 가능하다.

4. 사회·문화적 측면

극한환경에 적응한 극지생물 유래 대사체는 신규 의약, 산업소재 개발에 필수적이며, 21세기 국가 성장동력인 생물공학산업의 새로운 패러다임을 주도한다. 인류의 활동으로 천연자원이 고갈되고 있으며, 폐기물의 배출이 증가하고 있다. 이에 대한 해결책 중 하나는 효소의 다양한 산업 진입이었으며, 현재 지구온난화 같은 기후변화에 대응할 수 있는 저온성 효소를 다음 단계의 친환경 생물촉매제로 여기고 있다.

저온성 효소는 낮은 사용 에너지에서 공정을 수행하며, CO₂ 배출을 절감할 수 있다. 전 세계적으로 상승하고 있는 환경문제 해결 필요성에 대한 공감은 기존 산업의 구조적 변화를 불러올 것으로 예상되어 이에 대응할 수 있는 물질 중 하나는 극지 유래의 산업 신소재이다. 극지에서 지속적인 극지 생물 탐색과 관리시스템 구축으로 획득한 바이오 신소재는 실용화 연구에 활용되어 인류의 활동에 긍정적인 변화를 제공할 것이다. 또한, 극지 유래 바이오 신소재는 남극 영유권 분쟁과 자원개발 시점에 기초역량 자료로 제공되어 국가 대응체계 마련에 활용될 수 있다.

5. 연구 범위

본 연구의 최종 목표는 극지 고유생물 유래 산업용 저온효소의 상용화를 위한 생산공정 시스템 규명 및 활용 검증으로 이전의 연구 개발로 효소의 특성 연구가 완료된 저온성 단백질분해효소 R-P66에 대한 상용화 공정 시스템을 규명하는 것이다. 이전의 연구 개발로 R-P66의 구조적, 저온 활성 및 물리·화학적 특징을 규명하였고, 소규모 생산 프로토콜을 확보하였다 (Fig.1-2-1).

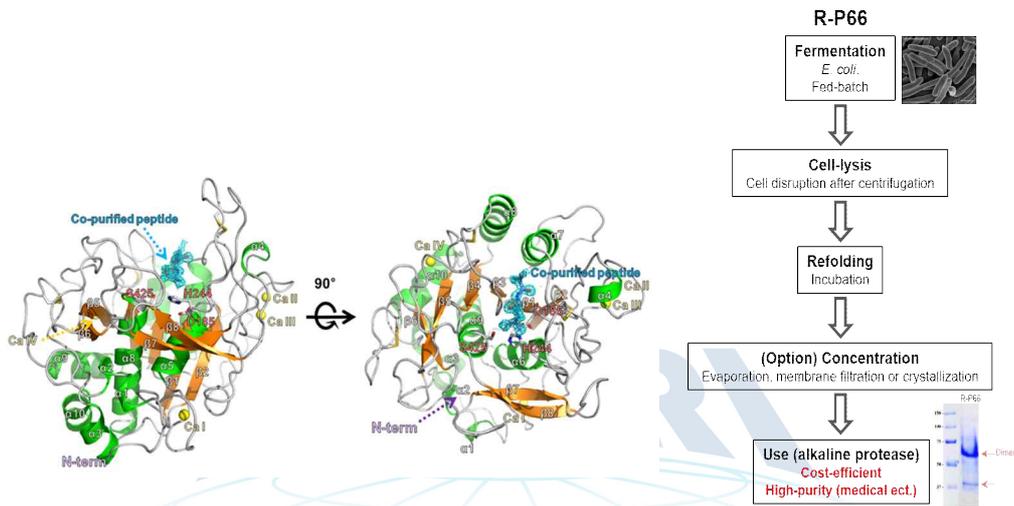


그림 1-2-1. R-P66의 구조와 R-P66 생산법

본 연구의 구체적인 사업내용은 “1) 상용화 대량생산 시스템 규명, 2) 상용화 저온효소 보존제 규명, 3) 저온효소 활용 자료 확보” 연구이다. 이를 통해 얻을 수 있는 예상 기대효과와 활용방안은 다음과 같다. 이러한 연구개발 추진체계는 그림 1-2-2에 제시되어 있다.

- 저온성 효소 상용화를 제약하는 조건을 극복할 수 있는 기초 자료 확보
- 저온성 효소의 최대 효율 생산을 위한 상용화 자료 확보
- 탄소중립 및 친환경 산업을 요구하는 세계화 추세와 관련하여 에너지 소비를 줄이고 청정한 화학공정을 완성하는 촉매제로의 역할 규명
- 국가 성장동력인 생물공학산업의 새로운 패러다임 제공
- 극지 생물유래 자원의 생물공학적 이용기술 확보, 실용화 연구 활성화 및 보존가치 규명
- 다양한 극지 유래 산업효소 탐색 및 개발의 교두보로서 친환경의 우수한 생체 촉매제로 산업적 활용을 증대시키고, 산업 환경개선에 기여

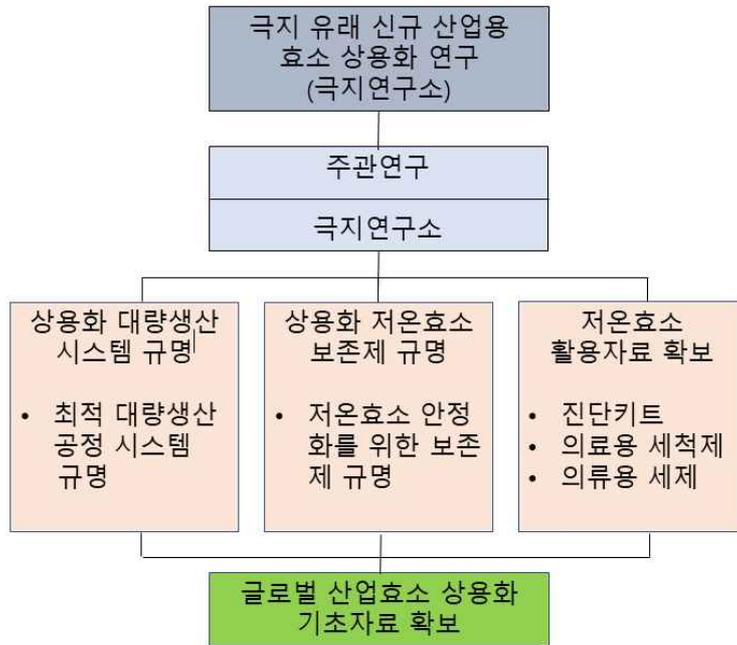


그림 1-2-2. 연구개발 추진체계

연구개발 추진체계는 각 연구개발 목표별의 핵심 내용으로 구체화하였으며, 3 개의 연구 개발 목표의 핵심적 내용은 각각 “1) 공정 생산균주의 분자진화, 생산 발효조건 규명 및 refolding 조건 규명, 2) 보존 최적화 및 제형 최적화, 3) 분자진단 키트, 의료용 세척제 및 의류용/식기 세척제 상용화 자료 확보”이며(그림. 1-2-3), 결과에 대한 평가범위를 표 1-2-1과 같이 설정하였다.

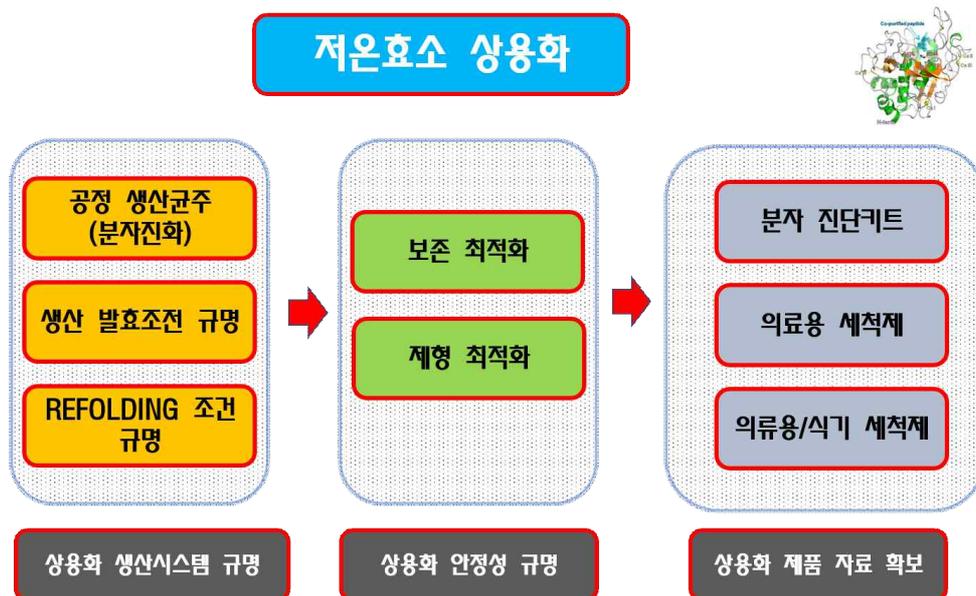


그림 1-2-3. 연구개발목표별 핵심내용

표 1-2-1 연구개발 결과에 대한 평가범위

구분	년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도	달성도
1차년도	2021	상용화 대량생산 시스템 규명	60%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공정 생산균주 개발(1건) ○ 3,000 L 급 발효생산(1건) ○ Refolding 조건 확립(1건) 	100%
		상용화 저온효소 보존제 규명	10%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 30 또는 37℃ 28일 효소 불안정화 조건에서의 75% 이상 효소 안정화제 조성 제조(1건) 	100%
		저온효소 활용자료 확보	30%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 진단키트용 단백질 활용 검증(1건) ○ 주방 세제용 단백질분해효소 활용 검증(1건) ○ 의류용 세제용 단백질분해효소 활용 검증(1건) 	100%

극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내적 측면

- 국내 효소 시장의 식품, 사료, 공업, 의료 분야에서 일부 효소를 자체 생산하여 자가소비를 하고 있지만, 대부분 수입품에 의존하고 있음
- 국내의 효소 생산자는 (주)아미코젠과 (주)제노포커스 등이며, 국내 효소 기술개발은 진단용, 시약용, 의약품 효소 같은 기존의 산업 효소 시장과 관련이 적은 새로운 효소제품 개발에 주력하고 있음
- (주)제노포커스는 COVID-19 분자진단에 사용되는 필수 효소인 proteinase K의 국산화에 성공함

2. 국외적 측면

- 일반 산업 효소의 주요 생산자는 Novozymes, Genencor (DuPont), BASF, DSM 등이 있으며, 전 세계 효소 시장의 약 70%를 Novozymes와 Genecor 등의 특정 기업이 독점하고 있음
- Novozymes의 산업효소는 Animal Health&Nutrition, Agriculture, Bioenergy, Fine Chemicals, Food&Beverages, Household care, Human Health, Leather&Textiles, Professional Cleaning, Pulp&paper, Water&Waste, Adadvanced Protein Solutions, Carbon Capture 및 Aquaculture 영역에 사용되는 다양한 효소 제품이며, 일부 산업을 제외한 대부분의 영역에서 Novozymes는 복합효소 제품을 제공함(표 2-1-1)
- Novozymes의 단백질분해효소들은 대부분 *Bacillus* 유래의 subtilisin으로 최고 활성 온도는 약 50℃이며, 현재까지 상용화된 진정한 저온성 단백질 분해효소는 없음
- Novozymes는 세제 내 계면활성제와 표백제 및 계면활성제에 대한 단백질분해효소의 변성을 억제하는 많은 특허를 보유하고 있으며, 단백질분해효소의 열 안정성 개선을 위한 화학물, 합성 보존제 조성 기술을 보유하고 있음
- Novozymes의 가장 최신의 보존제는 합성 보존제가 첨가된 Evity로 완전한 boron-free이나,

보존제 조성 정보 및 제조 방법은 알려져 있지 않음

- Novozymes의 분자적 개량을 통해 저온특성을 보유하여 출시한 단백질분해효소는 *Bacillus* 유래 subtilisin인 Savinase[®]과 Polarzyme[®]이며, Polarzyme[®]은 Savinase[®]보다 저온활성이 개선된 제품임
- 현재까지의 산업용 단백질분해효소에서 가장 뛰어난 저온성 효소 중 하나로 여겨지는 Polarzyme[®]은 Savinase[®] 대비 10 및 20℃에서 20 ~ 30% 및 10%의 활성 개선 제품이며, Polarzyme[®]은 40℃의 최고 활성을 기준으로 10 및 20℃에서 20 및 60%의 상대활성을 보유하며, 현재 Novozymes는 2005년 출시되었던 Polarzyme[®]의 단독 판매를 하지 않음(표 2-1-1)

표 2-1-1 Nozoymes사의 protease 단독 제품

Protease 상품명	적용산업	세분화 적용산업	특징
Ronozyme [®] ProAct	Animal Health& Nutrition	Animal nutrition	Endoprotease
ProAct360 TM			Broad specificity
Sustine [®] 210, 211, 220, 230	Fine chemicals	Protease	Serine endoprotease; pH 7-10 or pH 8-10; 30-50℃ or 30-70℃
Sustine [®] 240			Exopeptidase; pH 6-8; 45-60℃
Sustine [®] 250			Metallo endopeptidase; pH 7; 40-50℃
Alcalase [®]	Food& Beverages	Animal protein	pH 6.5-10; 60-75℃
Flavourzyme [®]			pH 4-8; 30-65℃
Neutrase [®]			pH 6-9; 30-65℃
Protana [®] Prime			pH 3-7; 20-55℃
Novo-Pro [®] D			pH 7-11; 55-75℃
Savinase [®]		pH 7-11; 55-75℃	
Protamex [®]		pH 6-9; 30-65℃	
Protana [®] UBoost		pH 4.5-10; 40-65℃	
Novozym [®] 11028		pH 4.5-11; 35-75℃	
Neutrase [®] conc BG		Dairy	pH 6-9; 30-65℃
Flavourzyme [®] conc BG			pH 4-8; 30-65℃
Protamex [®]			pH 6-9; 30-65℃
Alcalase [®] conc BG, Pure			pH 6.5-10; 60-75℃
Formea [®] CTL, TL, Prime			-
Galaya [®] Smooth		-	
Liquanase [®] Evity	Hosuehold	Laundry	Boron-free
Progress [®] Excel, Key			Boron 첨가
Progress [®] Uno100			Boron-free
Progress [®] Uno101			Boron 첨가
Savinase [®] Evity [®]			Boron-free

- 2018년부터 Novozymes는 ‘Climate water and Climate action’을 위한 저온성 효소 개발을 차기 목표로 삼고 있음
- 미국 PubMed에서의 ‘Cold-active enzyme’ 검색 결과를 토대로, 저온성 효소의 관심은 2014년까지 지속적으로 증가하였고, 2014년 이후로도 꾸준히 연구결과가 발표되어 전 세계적인 저온성 효소 개발 요구를 확인함
- 학술영역과는 다소 차이가 있는 저온성 효소의 산업적 활용 측면에서, 저온효소의 대량생산을 위한 효소 생산균주의 적절성, 생산발효 조건, 효소 생산 인자의 조절, 생산 후 보존제 개발 등의 다양한 연구 난제가 존재함
- 대표적인 상용화된 저온성 효소는 남극에서 분리한 *Candida antarctica*가 생산하는 지방분해효소 lipase B로 Novozymes에서 Novozyme 435라는 이름으로 세계적으로 독점 공급하고 있음
- Novozyme 435 lipase의 경우와 같이 저온성 효소의 탐색 및 상용화를 위해서는 극지 유래 생물 탐색이 중요하며, 이에 초점을 맞춘 연구가 전 세계적으로 진행 중임

KOPRI
극지연구소

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발에 대한 일반적 서론

1. 단백질분해효소(Protease)

가. 단백질분해효소

효소(enzyme)는 모든 살아있는 유기체의 생물학적 촉매제이며, “Green Chemical”로의 산업 변화에 따라 다양한 산업에서 사용되고 있다(Naveed et al., 2021). 인류의 활동은 천연자원을 고갈시키며, 환경과 삶의 질에 부정적인 영향을 미치는 많은 폐기물을 배출하고 있다. 증가하는 세계 인구와 다양한 국가의 경제 개선으로 가속화되고 있는 환경문제를 해결하기 위한 대안 중 하나로 효소 산업의 다양한 산업 진입을 뽑고 있다. 기질 특이성과 효율성을 특징으로 하는 환경친화적인 효소 중, 단백질분해효소(protease)는 산업용 효소로써 가장 많이 사용되고 있다(Kumar and Sharma, 2016; Nigam, 2013; Rekik et al., 2019). 단백질의 펩타이드 결합을 끊는 protease는 특수효소 및 산업효소가 포함된 전체 효소 시장의 약 40%, 산업효소 시장의 약 60%를 점유하고 있다(Muthulakshmi et al., 2011; Rao et al., 1998; Sharma et al., 2019; Wahab et al., 2017). Protease는 일반적으로 8 ~ 90 kDa의 분자량이며(Maitig et al., 2018; Souza et al., 2015), 효소 생산자, 효소 active site, 효소 활성 pH 또는 기질 반응 type에 따라 분류할 수 있다(Naveed et al., 2021; Rao et al., 1998).

식물, 동물 및 미생물 같은 다양한 살아있는 유기체는 모두 protease를 생산한다(Naveed et al., 2021). 식물 유래의 잘 알려진 protease는 Papain, Bromelain, Keratinase 및 Ficin이 있다(Naveed et al., 2021; Sawant and Nagendran, 2014). Papain은 파파야 열매 latex에서 얻을 수 있으며, 몇몇 proteinase와 peptidase의 isozyme이며, 넓은 pH 범위(pH 5.0 ~ 9.0)의 특성이 있고, 유제품 응고 및 단백질분해 활성을 갖고 있다. Bromelain은 파인애플의 잎, 과즙, 줄기 및 껍질에서 얻을 수 있는 cysteine protease로 암세포의 성장을 조절하는 것으로 알려져 있다(Chanalia et al., 2011). 일부 식물은 양모 및 모발 분해에 사용하는 Keratinase 또는 육류 tenderization에 사용하는 Ficin(protease mixture)을 생산한다.

동물 유래의 protease는 trypsin, rennin, chymotrypsin, enterokinase, elastase, thrombin, pepsin 등이 있다(Naveed et al., 2021). Trypsin은 장에서 발견되는 소화 관련 serine protease로 세균 배지 제조, 의료 목적에 주로 사용된다(Rao et al., 1998). Chymotrypsin은 분석, 진단 응용 분야에 사용되는 고가의 효소이며, pepsin은 산성에서 활성(pH 6.0 이상에서 변성)을 갖

는 aspartic protease로 유제품 산업에서 사용되고 있다(Veloorvalappil et al., 2013). Rennin은 pepsin 또는 자가분해에 의해 rannet 전구체에서 활성형으로 전환되는 protease로 유제품 산업에 사용되고 있다.

미생물 유래의 protease는 subtilisin, subtilase, proteinase K, thermolysin, collagenase 등이 있다(Naveed et al., 2021). 식물과 동물 유래의 protease는 긴 life-time, 재배 공간, 유전자 조작의 어려움 등으로 산업적 생산에 있어서 제한적이므로, 산업의 protease는 대부분 미생물 유래의 효소 특히 세포 외분비 protease이다. 현재, protease는 곰팡이, 세균 및 효모 같은 다양한 미생물에서 분리되어 다양한 산업에 적용되고 있다. 곰팡이의 protease는 넓은 기질 특이성, 효소의 환경 안정성, 넓은 기질 범위의 장점이 있으며, Genetically Regard As Safe(GRAS) 인 식으로 식품 산업에 널리 이용되고 있다(Benlurvankar et al., 2015; Sharma, 2019). Protease 생산 곰팡이로는 *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* 및 *Penicillium* spp. 등이 있다(Charles et al., 2008; Novelli et al., 2016; Oyeleke et al., 2010; Sharma, 2019). 세균의 protease는 대부분 알칼리성이며 높은 촉매 활성 및 생산력으로 인해 가죽, 식품, 세탁, 실크 및 세제 산업과 같은 다양한 산업에서 널리 이용되고 있다. 전 세계적으로 가장 잘 알려진 세균 유래 protease는 *Bacillus* spp.의 subtilisin이며, 일반적으로 산업의 세균 유래 protease는 50 ~ 70°C 및 pH 8 ~ 12 조건에서 높은 활성을 보인다(Santos et al., 2018; Romsomsa et al., 2010; Veloorvalappil et al., 2013).

(1) Exopeptidase

Exopeptidase는 단백질의 polypeptide chain의 말단 부근에서만 peptide 결합을 끊는 효소로, N- 및 C- 말단 작용에 따라 aminopeptidase(EC 3.4.11 및 EC 3.4.14) 및 carboxypeptidase(EC 3.4.16-3.4.18)로 구분된다(Rao et al., 1998). Aminopeptidase는 polypeptide chain의 N-말단부터 1, 2 또는 3 개의 아미노산을 인식하여 가수분해하여 single amino acid, dipeptide 또는 tripeptide를 방출하며, dipeptidyl peptidase, tripeptidyl peptidase로 세분화 할 수 있다. 일반적으로 aminopeptidase는 세균과 진균이 포함된 다양한 미생물에서 많이 발견되며, 대부분 세포 내부에서 존재한다(Watson, 1976). Carboxypeptidase는 polypeptide chain의 C-말단을 인식하여 single amino acid 또는 dipeptide를 방출한다. Carboxypeptidase는 active site에 따라 serine(EC 3.4.16), metallo(EC 3.4.17) 및 cysteine(EC 3.4.18) type으로 구분되며, 이 외에도 peptidyl dipeptidase(EC 3.4.15)와 dipeptidase(EC 3.4.13)는 carboxypeptidase로 포함·분류된다(Rao et al., 1998).

(2) Endopeptidase

Endopeptidase(EC 3.4.21-3.4.34)는 기질의 N- 또는 C-말단으로부터 먼 위치의 peptide 결합

합을 가수분해하는 효소로, 유리 아미노산 또는 carboxy group에 의해 효소 활성이 저해 받는다(Rao et al., 1998; Sawant and Nagendran, 2014; Siroya, 2020). Endopeptidase는 active site에 따라 serine(EC 3.4.21), cysteine(EC 3.4.22), aspartic(EC 3.4.23) 및 metallo protease(EC 3.4.24)로 세분화된다.

(가) Serine protease

현재까지 알려진 protease의 1/3은 serine protease이며, 대다수의 serine protease는 endopeptidase에 속한다(Page and Di Cera, 2008; Thakur et al., 2018). Serine protease는 aspartic acid, histidine 및 serine의 catalytic triad를 구성하며, 기질로부터 acyl-효소 중간체를 형성하여 기질을 가수분해한다. Serine protease는 일반적으로 중성 및 알칼리 pH에서 활성을 나타내며 최적의 조건은 pH 7.0 ~ 11.0이다. Serine protease의 가장 큰 하위 그룹은 alkaline serine protease로 기질의 tyrosine, phenylalanine 또는 leucine 부위의 peptide bond를 가수분해한다. *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Sterptomyces* 및 *Flavobacterium* spp. 등에서 alkaline serine protease가 생산되는 것으로 알려져 있다.

(나) Cysteine protease

Cysteine과 histidine의 catalytic dyad의 active site로 구성된 cysteine protease는 원핵 생물과 진핵 생물 모두에서 발견되며, 효소의 최적 활성 조건은 pH 6.0 ~ 8.0 및 50 ~ 70°C이다 (Muhammad, 2011). 일반적으로, cysteine protease는 환원제가 있을 때 활성화되며, 산화제에 의해 효소 활성이 억제된다. Cysteine protease는 papain-like, trypsin-like(arginine 아미노산 잔기 인식), glutamic acid 특이적 효소 및 기타 효소로 구분된다(Rao et al., 1998).

(다) Aspartic protease

대부분의 aspartic protease는 pH 3.0 ~ 4.0에서 최대 활성을 나타내며, 약 30 ~ 34 kDa의 분자량을 갖는다(Rao et al., 1998). Aspartic protease는 한 쌍의 aspartate로 구성된 중앙 catalytic site를 통해 촉매반응을 수행하며, 동물, 식물 및 미생물에서 발견된다. 미생물 유래의 aspartic protease는 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* 및 *Neurospora* spp.의 pepsin-like 효소와 *Endothia* 및 *Mucor* spp.의 rennin-like 효소로 나눌 수 있다.

(라) Metalloprotease

Metalloprotease는 2개의 금속 이온을 필요로 하며, 특히 아연 및 칼슘은 효소 활성 및 효소 구조 안정화에 중요한 것으로 알려져 있다(Ellaiah et al., 2002). Metalloprotease은 중성과 알칼리성으로 나뉘며, pH 5.0 ~ 9.0에서 최적의 활성을 보인다. EDTA 같은 금속 킬레이트제에

의해 활성을 잃는 metalloprotease는 collagenase, 뱀의 출혈성 독물, thermolysin 등이 있다.

나. 세균 유래 alkaline serine protease (subtilisin)

Serine protease는 6개의 클랜으로 그룹화할 수 있으며, 이 중 가장 큰 클랜은 (chymo)trypsin-like와 subtilisin-like(subtiliasin)이다(Ronald et al., 1997). Subtiliasin는 *Bacillus* spp. 유래 subtilisin, thermophile과 halophile 미생물의 thermitase 및 진균, 효모 및 일부 그람-음성 세균의 proteinase K family로 나눌 수 있다. *Bacillus* spp. 유래의 subtilisin은 두 번째로 큰 serine protease 그룹으로 alkaline serine protease를 대표한다(Rao et al., 1998). Subtilisin Carlsberg는 *Bacillus licheniformis*에서 발견되었으며, subtilisin NOVO와 BPN'은 *Bacillus amyloliquefaciens*에서 발견되었다. Subtilisin은 60°C, pH 10.0에서 최적의 활성 특성이 있으며, Ser221, His64 및 Asp32로 구성된 catalytic triad를 통해 광범위한 기질 특이성을 갖고 있다.

대부분의 alkalophilic 미생물은 alkaline protease를 생산하여 *Bacillus* spp. 외에도 몇몇 세균(*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Kurthia*, *Sterptomyces* 및 *Psiloterterredo* spp.), 진균(*Aspergillus*, *Dendryphilella* 및 *Scolebasidium* spp.) 및 효모(*Candida*, *Yarrowia* 및 *Aureobasidium* spp.)는 alkaline protease를 생산하는 것으로 알려졌다(Kumar and Takagi, 1999). 산업의 관점에서, 발효 및 생산조건의 최적화로 alkaline protease 생산 수율을 향상하고, 경제성을 실현한 일부의 alkaline protease(대부분 *Bacillus* spp. 유래)만이 다양한 산업에 적용되었으며, 이 효소들은 지속적인 분자적 진화를 이루고 있다.

표 3-1-1 상용화된 alkaline protease(Kumar and Takagi, 1999).

Organism	상품명	생산자
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalase	Novozymes
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Savinase, Esperase	Novozymes
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Maxacal, Maxatase	Gist-brocades
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Opticlean, Optimase	Slovay Enzymes GmbH
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Proleather	Amano Pharmaceuticals
<i>Aspergillus</i> sp.	Protease P	Amano Pharmaceuticals
Protein engineered variant of Savinase	Durazym	Novozymes
Protein engineered variant of Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Maxapem	Slovay Enzymes GmbH
Protease from <i>Bacillus lentus</i> (Expressed in <i>Bacillus</i> sp.)	Purafect	Genencor

2. Protease의 대표산업

2021년 전 세계 효소 시장은 124억 달러로, 2030년까지 연평균 6.42%로 성장이 예상되며¹⁾, 2022년 전 세계 단백질분해효소 시장은 20억 달러로, 2033년까지 연평균 7.8%의 성장이 예상된다²⁾. Protease는 입체 특이성, 기질 특이성, 생분해성 등의 특징으로 세제 산업, 감염 진단 및 R&D, 가죽 가공, 식품 산업, 육류 가공, 치즈 제조, 제지 및 펄프, 사진 필름으로부터의 은 회수, 화장품 산업, 화학 산업 및 생물학적 오염 정화 공정 등의 많은 산업 분야에서 사용되고 있으며, 염증 및 유해한 병변에 대한 치료 목적의 치료제로도 사용될 수 있다(Fazilat, 2016; Munawar et al., 2014; Muthulakshmi et al., 2011; Wahab et al., 2017).

가. Subtilisin

(1) 세제 산업

1963년 *Bacillus licheniformis*의 subtilisin Carlsberg가 세제 산업에 도입되면서 효소 산업의 발전이 이루어졌다. 현재, 산업 효소의 30%는 protease이며, 생명공학의 많은 응용 분야에서 protease는 주도적인 역할을 수행하는 소재 중 하나로 여기고 있다(Naveed et al., 2021). 전 세계의 2022년 세제 산업 시장은 약 1,543억 달러로 예상되며, 연평균 6.3% 성장률로 성장하여 2029년 약 2,429억 달러 규모를 형성할 것으로 예상된다³⁾.

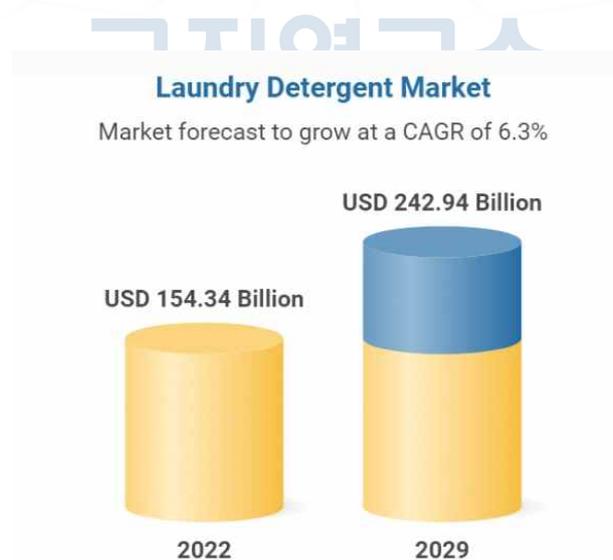


그림 3-1-1. 전 세계 세탁세제 시장 규모³⁾

1) Enzyme Market, Precedence Research, 2022

2) Protease Market, Future Market Insights, 2023

3) Laundry Detergent Market, Research and Markets, 2021

세제에 사용되는 효소는 다양한 오염 성분을 더 작은 수용성 분자로 가수분해하는 것으로, protease는 세제의 표백제, 빌더 및 계면활성제만으로 제거하기 어려운 얼룩 제거를 위해 사용된다(Khan, 2013; Thakur et al., 2018). 현재 시장에서 사용되는 세제용 protease 대부분은 *Bacillus* spp. 유래의 serine protease이다. Subtilisin 같은 alkaline serine protease는 음식, 혈액 및 기타 신체 분비물로 인해 발생된 다양한 얼룩 제거를 할 수 있는 광범위한 기질 특이성을 갖고 있다. 전통적인 세탁 세제에는 많은 음이온성 계면활성제 및 세제 첨가 화학물(산화제 및 킬레이트제 등)이 첨가되어 있었고, 이에 따라 높은 pH 및 높은 온도의 세탁 조건이 요구되었기 때문에 subtilisin이 많이 사용되었다.

현재는 에너지 위기와 에너지 절약 및 환경오염 등에 대한 인식의 상승으로 낮은 온도에서 활성을 갖는 protease 활용이 바람직하게 여겨지고 있다(Rao et al., 1998). 또한, 화학물을 줄이고 protease 포함 multi-enzyme(lipase 또는 amylase 등의 추가 첨가)이 첨가된 세제 제품 출시가 늘어나고 있다. 낮은 온도 세탁에서 세제 내 화학물은 낮은 수용성을 보이기 때문에, 오염원 등의 얼룩 제거 효율이 낮다. 낮은 온도 세탁의 효율성을 보장하기 위해 저온성 protease 상용화가 필요하지만, 현재까지 저온성 protease의 상용화 사례는 없다(Bjerre et al., 2013). 주방 세제에는 주로 amylase 및 lipase가 사용되었으나, 자동 식기 세척기의 보급 증가로 protease 사용 빈도가 높아지고 있다.

(2) 의료기기 세정제

의료기기 세척은 물과 기계적 마찰, 세제를 이용하여 이물질 제거하는 과정으로 세균의 아포를 제외한 미생물을 제거하는 모든 소독 과정의 전 단계에 실시해야 한다⁴⁾. 의료기기 세척은 Presoaking/precleaning과 automatic cleaning의 과정에 속하며, 의료기기 세척 후 멸균, manual cleaning 및 disinfection의 과정을 거친 의료기기는 재사용되고 있다.

의료기기 세정제는 중성세제, 약산성 또는 약알칼리성 세척제 및 효소 첨가 세정제가 있다. 효소 세정제는 혈액, 체액 등의 단백질이 주성분인 유기물 제거에 뛰어나며, 다른 세정제에 비해 낮은 독성의 장점이 있다. 2019년 전 세계 의료기기 세정제 시장은 약 18억 달러였으며, 7.9%의 연평균 성장률로 성장하여 2025년의 시장 규모는 26억 달러로 예상된다⁵⁾.

급성 및 만성 질환의 발생 빈도의 증가, 수술률 상승, 고령화 인구 증가 및 2020년 말에 발생한 COVID-19로 인해 실제 시장 성장률은 예상을 뛰어넘을 것으로 예측된다. 2014년 국내 수술실 및 내시경실의 68.5% 및 79.6%는 효소 세정제를 사용하고 있으며, 미국 CDC Guide Line, 한국 식약청, 수술실간호사회 및 대한위대장내시경학회 등은 효소 세정제 사용을 권고하고 있다(Jeong et al., 2014).

4) 의료기관 사용 기구 및 물품 소독 지침, 보건복지부고시 제2020-295호

5) Medical device cleaning market, Markets and Markets, 2018

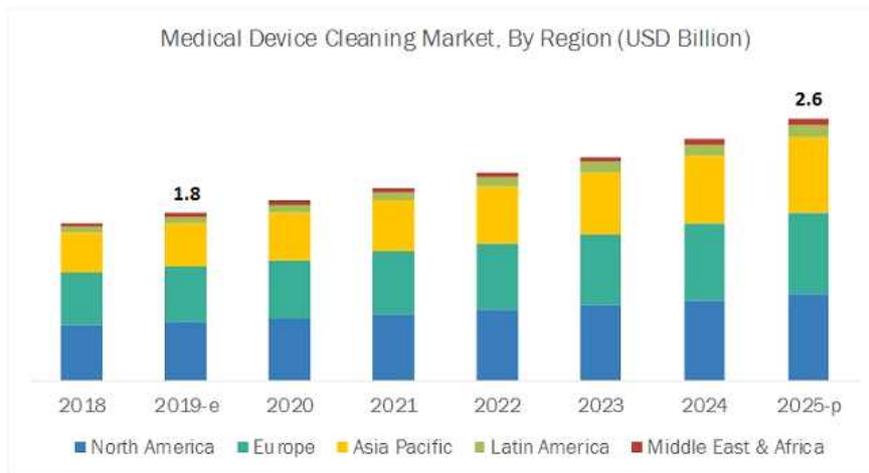


그림 3-1-2. 전 세계 의료기기 세정제 시장 규모⁵⁾

효소 세정제는 single(subtilisin), dual(subtilisin과 amylase) 또는 multi(subtilisin을 포함한 2종 이상의 효소) enzyme과 비이온성 계면활성제, buffer, 보존제, 착색제, 착향제, 소포제 및 부식방지제 등으로 구성된다. 내시경기구 및 accerssory, 수술기구, 치과기구, 비뇨기과 기구, 임상병리실 기구 및 혈액투석기구 등의 세정에 사용되고 있는 효소 세정제는 약 50%의 단백질로 구성된 혈액과 인체 유래 biofilm 형성 가능 물질의 멸균 전 세정에 효과적이다. 현재의 의료용 효소 세정제 시장 제품은 3M 사의 Rapid Multi-Enzyme Cleaner(RMEC)와 Johnson&Johnson 사의 Cidezyme 등이 있다. 두 제품 모두 중성 pH의 제품이며, 자동세척기용 RMEC는 subtilisin, amylase, cellulase 및 lipase 복합 효소로 구성되어 있으며, Cidezyme은 5% 이하의 subtilisin이 첨가되어 있다.

(3) 사료

동물 사료시장은 2020년 4,249억 달러였으며, 연평균 4.6%의 성장률로 성장할 것으로 예측되고 있다⁶⁾. 동물 사료의 소화율 증가와 영양분 배설량 저감은 환경오염을 줄이는 데에 직접적으로 관련된다.

2016년 국내의 정화시설 방류수 수질기준은 40 ~ 250 mg/L 이하의 총 질소와 인의 합량 방류수 방류 허용으로 제한하고 있다. 환경오염 예방을 위해, 동물 사료에서 효소 사용이 증가하고 있으며, 효소 사용은 영양소 소화율을 증가시키는 것으로 알려졌다(Gupia et al., 2022). 특히, 동물 사료의 protease는 아미노산 가용성 개선, 전분 및 지방 소화율 개선, 장 탄력성, 장 건강 등의 개선에 이점을 부여하는 것으로 알려졌다(Cowieson and Roos, 2016).

6) Animal Feed Market, Polaris, 2021

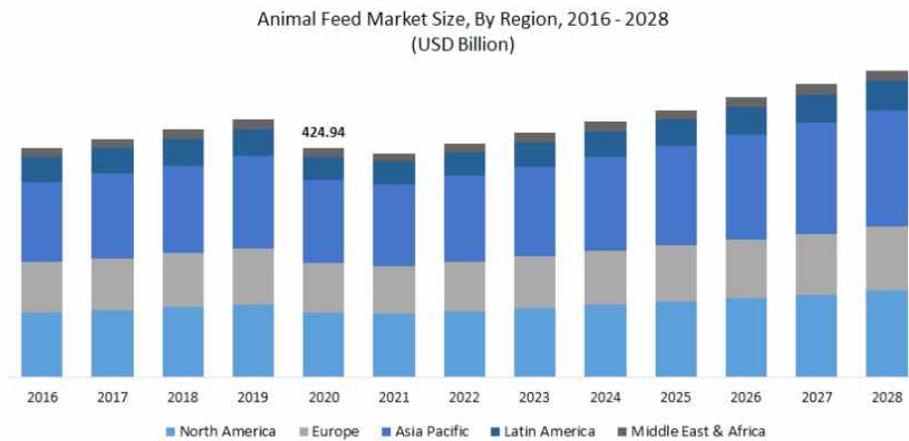


그림 3-1-3. 전 세계 동물 사료 시장 규모⁶⁾

*Bacillus licheniformis*와 이 세균에서 생산되는 재조합 효소들은 비병원성 및 비독성으로 판단되어 현재 사료 사용 효소는 *B. licheniformis*를 숙주로 하여 생산되고 있다(Cowieson and Roos, 2016; Pariza and Johnson, 2001). 해외에서 *B. licheniformis*의 subtilisin을 단독 사용한 동물 사료 배합 사례는 현재까지 없지만, 최근 EU 규정 N1831/2003의 요구 사항과 해당 지침(EFSA, 2012)을 준수한 subtilisin의 단독 사용 연구가 보고 되었다(Cupia et al., 2022). 이 연구에 따르면, subtilisin은 세포독성, 유전독성, 체외 자극성 및 아만성 경구독성의 부작용을 일으키지 않았으며, 육계의 체중 및 사료 소화 전환율을 개선시켰다. 따라서, subtilisin은 사료 첨가제 사용의 좋은 후보 효소로 여겨지고 있다.

나. Proteinase K

COVID-19 팬데믹으로 분자진단(핵산추출 후 시퀀싱)과 면역진단(항원검출 후 항체검출)의 시장 규모가 상승하여 2022년 전 세계 분자진단의 시장 규모는 232억 달러였으며, 5.4%의 연평균 성장률로 성장하여 2027년 전 세계 분자진단 시장은 302억 달러에 도달할 것으로 예측된다⁷⁾. 이에 따라 전 세계의 proteinase K 시장은 약 3%의 연평균 성장률로 성장이 예상되며, 주요 생산자는 QIAGEN, Merck, ThermoFisher 및 G-BIOSCIENCE 등이 있다⁸⁾.

Proteinase K는 진균 *Engyodontium album* 유래의 protease로, keratin을 가수분해하여 명명된 효소이며, 현재 proteinase K family 효소는 진균, 효모 및 그람-음성 세균에서 발견되고 있다(Ebeling et al., 1974; Larsen et al., 2005). Peptidase S8 family에 속하는 proteinase K의 분자량은 28.9 kDa이며, DNA 및 RNA 추출에 많이 사용된다. Proteinase K는 SDS, urea, guanidine, 킬레이트제 같은 단백질 변성제에서 안정하며, DNase와 RNase를 효율적으로 불활

7) Molecular Diagnostics Market, Markets and Markets, 2022

8) Proteinase K Market, Mordor Intelligence, 2022

성화 시키고, 핵산 주변에 존재하는 단백질을 분해한다. 핵산 추출 효율이 중요한 분자진단의 영역에서, COVID-19 분자진단은 sample collection, viral transport medium으로의 virus 부유, virus lysis 및 RT-PCR의 단계로 진행되고 있으며, virus lysis 단계에서 proteinase K가 사용되고 있다(Esbin et al., 2020).

3. 대장균 고밀도 배양과 inclusion body

대장균은 저렴한 제조 비용 및 생산 효율의 장점이 있는 단백질 생산 시스템으로 대장균에 의해 생산되는 단백질은 산업용 효소(예, renin, amylase, protease 및 cellulase)와 치료용 단백질(예, filgrastim, insulin, 성장 호르몬 및 interferon) 등이 있다(Eiteman and Altman, 2006).

대장균의 고밀도 배양(High Cell Density Culture) 기술은 대장균에서의 단백질 생산 연구를 촉진시켰다(Choi et al., 2006; Jeong and Lee, 1999). 대장균 고밀도 배양은 비용 효율성 증가, 배양 부피 절감, 다운스트림 처리 개선, 폐수 감소, 생산 비용 감소 및 장비 투자 감소의 이점이 있다. 대장균 발현시스템에서의 최대 단백질 생산을 위해서는 영양소 구성, feeding, 온도, pH 및 DO 등을 조절해야 한다.

대장균의 고밀도 배양에서 주요하게 고려해야 할 것은 대규모 발효기에서의 실현 가능성과 대장균의 유가식 발효에서 생산되는 부산물인 아세트산 생산 억제 방안이다. Glucose를 이용하는 유가식 발효의 대장균 세포는 호기성 조건에서 세포 외분비 부산물로 아세트산을 생산한다. 아세트산 생산은 세포의 성장 속도 또는 glucose 소비 속도와 직접적인 관련이 있으며, 0.5 g/L 이하의 아세트산 축적만으로도 대장균 성장 및 재조합 단백질 생산은 저해된다(Eiteman and Altman, 2006). 아세트산은 완전한 호기성 조건에서도 산소 소비율과 관계없이 세포가 임계 성장 이상으로 성장할 때 생성되기 때문에, 대장균의 성장 속도와 산소 소비의 균형을 맞춰야 한다. 재조합 단백질의 생산 측면에서, 아세트산은 대장균의 전사-번역 시스템에 관여하는 유전자에 영향을 미치고, methionine 생합성을 방해하여 homocysteine이 축적되게 한다. 대장균의 성장 속도 조절 외에 아세트산 생산을 줄이는 방법으로는 ① glucose의 mannose 또는 fructose로의 대체, ② yeast extract, methionine 또는 glycine을 배지에 보충, ③ glucose의 glycerol 대체, ④ glucose pulse 도입 및 ⑤ 대장균 내 acetate 형성 pathway에 대한 유전적 변형 등이 있다.

대장균은 disulfide bond을 포함한 거대 단백질과 post-translation이 필요한 단백질 생산에 적합하지 않다(Choi et al., 2016). 또한, 대장균의 단백질 생산에서 빠른 재조합 단백질 합성 속도 또는 그와 무관하게 inclusion body(I.B., 봉입체)의 형태로 단백질 생산이 이루어지는 경우가 있다. 대장균 cytosol에서 단백질 생산 및 folding이 진행되는 경우 발생하는 단백질 I.B.는 단백질 변성/refolding 과정을 거쳐야 하는 단점이 있다. 대장균이 단백질 I.B.로의 생산에 대한 장점은 정제의 용이성, 숙주 세포에 대한 비독성, 세포 내에서의 단백질분해 내성 등이

있다. I.B.는 변성제 이용 가용화 및 변성제 제거의 단백질의 refolding 과정으로 활성 단백질로 전환된다(Singh and Panda, 2005). 일반적으로 refolding에 의한 I.B.로부터의 활성 단백질의 수율은 약 15 ~ 25%이며, I.B.의 refolding은 대장균에서의 재조합 단백질 생산에서 많은 비용을 추가 요구하는 것으로 알려져 있다(Datar et al., 1993). 최근의 연구에서 I.B. 회수를 위한 세포 파쇄의 압력 및 횟수 조건과 I.B.의 mild 가용화에 따라 refolding 수율은 증가하는 것이 밝혀졌다(Eggenreich et al., 2020; Ramanan et al., 2009; Upadhyay et al., 2015).

4. Aim

남극 해양성 세균 *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717 유래의 저온성 단백질분해효소 R-P66의 산업적 특성(저온활성, 기질특이성, 물리·화학적 특성, 발효 및 정제도 등)과 단백질 구조적 특성(칼슘 결합 부위, 기질 pocket size 및 disulfide bond 등)에 대한 연구가 완료되어 논문 게재와 특허 등록(한국, 중국, 유럽 및 미국)이 완료되었다(Park et al., 2018a; Park et al., 2018b; Han et al., 2016). 또한, 재조합 대장균의 발효, 대장균에서 생산되는 R-P66 I.B.의 refolding, 효소 농축 및 보존제 탐색이 진행되었다.

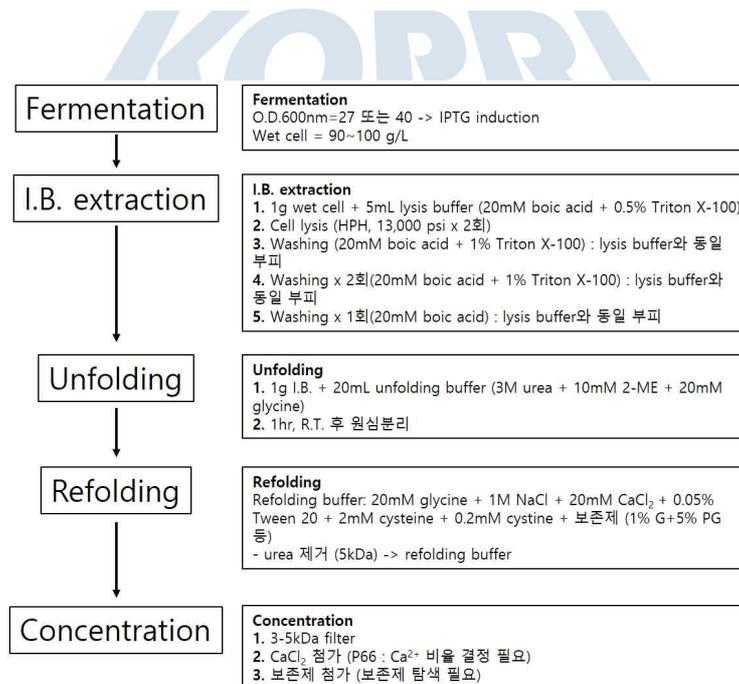


그림 3-1-4. 이전에 확립된 R-P66 생산법

본 연구에서는 R-P66의 산업 진입을 위해 발효, I.B. 추출, unfolding/refolding, 효소 농축 및 보존제에 대한 효율적 방안 탐색을 수행하였고, 생산된 R-P66의 세탁 세제, 주방 세제 및 감염 진단의 산업 적용 가능성을 확인하였다.

제 2 절 연구방법

1. R-P66 생산 균주, 효소 활성화 및 효소 활성 측정

가. R-P66 생산 균주

Pseudoalteromonas arctica PAMC 21717 유래 protease의 전체 유전자에서 prosequence와 catalytic domain만으로 구성된 R-P66 유전자를 함유한 pET28a 벡터가 삽입된 *E. coli* BL21 (DE3)를 활용하여 저온성 단백질분해효소 R-P66을 생산하였다. R-P66의 생산은 재조합 *E. coli* 발효, 대장균으로부터 불활성 R-P66 I.B. 회수 및 활성형 R-P66으로의 전환으로 구성하였다. 또한, *tac* promoter와 2 개의 연속된 R-P66 유전자를 삽입한 발현 벡터를 제작하여 *E. coli* BL21 (DE3)에 삽입하였다.

나. 효소 활성화

재조합 *E. coli* 발효액 내 세균을 균질화기(Nano disperser, Microfluidizer 또는 High Pressure Homogenizer)로 파쇄하였다(12,000 psi, 2 회). 세포 파쇄 및 원심분리(10,000×g, 30 분)를 통해 얻은 R-P66 I.B. 포함 불용성 분획을 세척 또는 미세척하여 R-P66 I.B.를 회수하였다. R-P66 I.B. 세척은 다음과 같이 진행하였다: 1% Triton X-100 및 20 mM boric acid(pH 8.0)로 구성된 세척액과 20 mM boric acid(pH 8.0) 세척액으로 2 회 및 1 회 세척(10,000×g, 30 분). 회수된 1 g의 R-P66 I.B.를 20 mL unfolding buffer(pH 8.0; 3 M urea, 10 mM mercaptoethanol, 20 mM glycine)에 첨가하고 3 시간 동안 상온에서 가용화하였다. 변성된 단백질 용액을 다양한 refolding 조건에서 활성화하였다. 대장균의 발효부터 효소의 활성화 과정은 상용화를 목적으로 일부 변경되었으며, 이에 대한 정보는 '제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과의 제 2 절 2. R-P66 생산을 위한 발효'부터 기술되었다.

다. 효소 활성 측정

생산된 R-P66의 단백질분해 활성 측정을 위해, 1 ug 효소, 0.65% azocasein 및 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 구성된 1.1 mL의 반응액을 제조하였다. 반응액을 30°C, 30 분 동안 배양한 후, 0.9 mL의 110 mM trichloroacetic acid를 첨가하여 효소 불활성화 및 잔존 casein 침전을 유도(상온, 30 분)하였다. 원심분리(12,000×g, 상온, 3 분)를 통해 얻은 상층액에 대한 440nm 흡광도를 측정하여 효소 활성에 따라 방출되는 azo-dye의 양을 확인하고, 1 unit은 반응 온도에서 1 분 동안 1 mg 효소에 의한 흡광도 1의 변화로 정의하였다. 정밀한 효소 활성의 정량값은 trichloroacetic acid 침전 후의 상층액에 대한 추가적 발색 반응으로 측정하였다. 0.5

mL의 침전 상층액, 0.25 mL Folin&Ciocalteu's phenol 및 1.25 mL의 500 mM sodium carbonate를 혼합하여 phenol 기를 함유한 아미노산의 발색을 유도하였다(상온, 30 분). 660nm 흡광도를 측정한 후, L-tyrosine 표준 곡선에 기초하여 효소 활성을 정량화하였다. 정량화된 단백질분해효소의 활성 1 unit은 측정 온도에서 1 mg 단백질이 1 분 동안 1 nmole의 aromatic 아미노산 방출로 정의하였다.

2. R-P66 생산을 위한 발효

가. 종 배양

R-P66 유전자를 함유하는 *E. coil* BL21 (DE3)를 200 mL의 LB 액체배지에 접종 및 배양하였다(37°C, 1 일). 배양액을 5 L jar 발효기에 접종하고 다양한 유가식 발효 조건에서 배양하였다. 크게 3 종의 배양 발효 배지(유가식 발효 ①-③)⁹⁾와 이에 따라 세분화된 배지 조성으로 발효를 구성하여 최적의 발효 조건을 확인하였다.

나. 유가식 발효 ①

초기 발효 배지(배양배지 ①)¹⁰⁾로 구성된 발효 배지를 배양 온도 36°C, 및 pH 6.8 ~ 7.0이 유지되도록 조절하였다. 영양분, agitation speed, air 및 O₂ 등을 조절하며 pH, DO 및 배지 내 glucose 양을 측정하였으며, 초기 발효 배지 내 당이 모두 소모되면 Feeding 배지를 특정 속도로 첨가하였다. 세균 생장의 흡광도 600nm 값이 목표값에 도달하면 IPTG를 첨가하여 R-P66 발현을 유도하였다. Feeding 배지의 소진, pH 또는 DO가 상승하면, 발효를 종료하고 SDS-PAGE 분석을 통해 단백질 발현을 확인하였다.

다. 유가식 발효 ②

초기 발효 배지(배양배지 ②)¹¹⁾로 구성된 발효 배지를 배양 온도 36°C, 및 pH 6.8 ~ 7.0이 유지되도록 조절하였다. 영양분, agitation speed, air 및 O₂ 등을 조절하며 pH, DO 및 배지 내 glucose 양을 측정하였으며, 초기 발효 배지 내 당이 모두 소모되면 Feeding 배지를 특정 속도로 첨가하였다. 세균 생장의 흡광도 600nm 값이 목표값에 도달하면 IPTG를 첨가하여 R-P66 발현을 유도하였다. Feeding 배지의 소진, pH 또는 DO가 상승하면, 발효를 종료하고 SDS-PAGE 분석을 통해 단백질 발현을 확인하였다.

9) 기술 노하우로 기재 안함(유가식 발효 ①-③ 조성)

10) 기술 노하우로 기재 안함(배양배지; ① 조성)

11) 기술 노하우로 기재 안함(배양배지; ② 조성)

라. 유가식 발효 ③

초기 발효 배지(배양배지 ③)¹²⁾로 구성된 발효 배지를 배양 온도 36℃, 및 pH 6.8 ~ 7.0이 유지되도록 조절하였다. 영양분, agitation speed, air 및 O₂ 등을 조절하며 pH, DO 및 배지 내 glucose 양을 측정하였으며, 초기 발효 배지 내 당이 모두 소모되면 Feeding 배지를 특정 속도로 첨가하였다. 세균 생장의 흡광도 600nm 값이 목표값에 도달하면 IPTG를 첨가하여 R-P66 발현을 유도하였다. Feeding 배지의 소진, pH 또는 DO가 상승하면, 발효를 종료하고 SDS-PAGE 분석을 통해 단백질 발현을 확인하였다.

마. R-P66 생산을 위한 상용화 발효

R-P66 생산을 위한 상용화 발효는 30, 500 및 5,000 L 발효기에서 수행하였다. 재조합 대장균을 LB 액체배지에 순차적 계대 배양하여 초기 발효 배지의 5 ~ 10% 종배양액을 준비하였다(37℃). 종배양액을 초기 발효 배지에 접종한 후, 배양 온도 36℃ 및 pH 6.8 ~ 7.0를 유지하며, agitation speed 및 air 주입량을 조절하고 DO의 변화를 확인하며 배양을 진행하였다. 초기 발효 배지 내 당이 모두 소비되면 Feeding 배지를 일정 속도로 주입하여 유가식 발효를 진행하였다. O.D.600nm 50에 도달하면 0.5 mM IPTG를 첨가하고 R-P66을 생산하였으며, R-P66의 생산 정도는 SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다.



그림 3-2-1. 한국생명공학연구원의 Feeding 및 Seed Tank와 5,000 L 발효기

12) 기술 노하우로 기재 안함(배양배지; ③ 조성)

3. R-P66 I.B. 추출

가. 세포 파쇄 확인

발효액을 원심분리(9,000 rpm, 20 분)하여 R-P66 I.B.가 생산된 재조합 대장균 세포를 회수하였다. 회수된 세포 1 g(wet)과 5 mL lysis buffer(pH 8.0; 20 mM boric acid, 0.5% Triton X-100)를 혼합한 후, 500 ~ 1,000 bar 압력의 Nano disperser에서 혼합액을 통과시켰다. 1 또는 2 회 통과한 혼합액과 대조군(Nano disperser 통과 없이 보관)을 LB^{kan50} 고체 배지에 도달한 CFU 분석을 통해 압력 및 통과 횟수에 따른 세포 파쇄 정도를 확인하였다.

배양액 원심분리 및 lysis buffer 첨가의 세포 부유 혼합액 제조 과정 없이 발효액에 0.5% Triton X-100을 첨가 또는 미첨가한 후, 1,000 bar 압력의 Nano disperser에서 발효액을 1 또는 2 회 통과시켰다. 세포 파쇄 정도는 LB^{kan50} 고체 배지 도달 CFU로 확인하였다. 세포 파쇄액을 원심분리(9,000 rpm, 20 분)하여 wet R-P66 I.B.(이하 R-P66 I.B.)를 회수하였다.

나. 세포 파쇄 횟수 결정

발효액에 20 mM boric acid(pH 8.0)과 0.5% Triton X-100을 첨가하여 세포 파쇄 및 R-P66 I.B. 회수를 수행하였다. 900 bar의 Nano disperser를 이용하여 1 ~ 5 회의 세포 파쇄를 진행하였으며, 원심분리(9,000 rpm, 20 분) 후 얻은 R-P66 I.B.를 2 회의 Triton X-100 washing(5 mL/g cell weight; pH 8.0; 20 mM boric acid, 1% Triton X-100)과 1 회의 buffer washing(5 mL/g cell weight; pH 8.0; 20 mM boric acid)하여 R-P66 I.B.의 정제를 수행하였다. 정제된 R-P66 I.B.에 물을 첨가하여 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

다. I.B. 회수 최적화

(1) 세포 파쇄 chamber 타입

균질화기 Nano disperser의 Z- 및 Y-type chamber는 통과 용액을 균질화 또는 세포 파쇄하기 위한 부품이다. 두 type의 chamber에 의한 R-P66 I.B. 회수 차이를 결정하기 위한 세포 파쇄를 수행하였다. 각 type의 chamber가 장착된 Nano disperser를 이용하여 7,500 ~ 20,000 psi 압력으로 발효액을 1 ~ 2 회 파쇄하였다. Triton X-100 washing과 buffer washing을 거친 R-P66 I.B.에 대한 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

(2) I.B. 회수

원심분리(9,000 rpm, 20 분)한 발효 세포에 lysis buffer를 첨가한 부유액과 원심분리 하지 않은 발효액을 950 bar 압력의 Nano disperser에서 2 회 통과시켰다. 세포 파쇄액을 2 회의 Triton X-100 washing과 1 회의 buffer washing 한 후 회수하거나 특정 washing 없이 회수

하였다. 회수된 R-P66 I.B.의 무게를 측정하고 I.B. 내 단백질 함량은 SDS-PAGE 분석으로 확인하였다.

라. 산업용 발효의 발효액으로부터 I.B. 회수

30 및 500 L 발효기에서 배양한 재조합 대장균 발효액에 0.5% Triton X-100을 첨가 또는 미첨가하여 세포 파쇄를 수행하였다. 세포 파쇄에 사용된 기기는 High Pressure Homogenizer(Avestin Emulsiflex)였으며, 1,250 bar×2 pass로 파쇄한 파쇄액으로부터 R-P66 I.B.를 회수하였다(Tubular 또는 Disk centrifuge). 회수한 R-P66 I.B.를 이용하여 활성형 R-P66 생산을 위한 I.B. unfolding과 I.B. refolding을 수행하였다.

4. 활성형 R-P66 생산

가. Unfolding

(1) Urea 농도 및 unfolding 용액 내 I.B. 함량

1 g R-P66 I.B.를 0 ~ 6 M urea가 포함된 20 mL의 unfolding 용액-1¹³⁾에 녹인 후(상온, 3 시간), 원심분리(9,000 rpm, 20 분)한 상층액과 침전물에 대한 SDS-PAGE 분석 및 상층액의 단백질 함량을 측정하였다. 1 g R-P66 I.B.를 4 ~ 6 M urea가 포함된 20 ~ 40 mL의 unfolding 용액에 녹이고 원심분리로 획득한 상층액의 단백질 함량을 측정하였다.

(2) Unfolding 불용성 분획

1 g R-P66 I.B.를 첨가한 20 mL의 unfolding 용액-2¹⁴⁾을 homogenizer로 균질화(상온, 3 시간)한 후, 20 mL의 추가 unfolding 용액을 첨가하여 unfodling을 진행하였다(상온, 1 시간). 원심분리를 통해 얻은 unfolding 상층액의 단백질 측정 및 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. D.W. washing을 수행한 원심분리 침전물의 무게를 측정하고, 단백질 측정 및 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

(3) Buffer 선별

약 1.5 g의 R-P66 I.B.를 동결건조하였다. 0.2 g의 건조 R-P66 I.B.에 14.5 mL의 unfolding 용액에 첨가하였다. Unfolding 용액 내 buffer는 Tris-HCl, boric-NaOH, glycine-NaOH 또는 NaHCO₃였으며, unfolding 용액에서 가용화된 unfolded R-P66의 단백질량을 측정하였다.

13) 기술 노하우로 기재 안함(unfolding 용액-1 조성)

14) 기술 노하우로 기재 안함(unfolding 용액-2 조성)

(4) Unfolding 용액의 urea 제거

1 g R-P66 I.B.를 20 mL의 unfolding 용액에서 가용화한 후(상온, 3 시간), 원심분리(9,000 rpm, 20 분)한 unfolded R-P66 I.B. 상층액을 20 mM glycine(pH 8.0)으로 0.4 ~ 3 M urea가 되도록 희석하였다. 각 희석액을 30 kDa cut-off membrane으로 농축하여 초기 부피로 전환한 후, 단백질 측정과 refolding을 진행하였다. 0.4 M urea의 unfolded R-P66은 30 kDa cut-off membrane으로 4 배 농축한 후 4 또는 -20°C에서 보관하며 unfolded R-P66의 안정성을 단백질 농도 측정으로 확인하였다.

나. Refolding

(1) 산업용 발효 I.B. refolding

30 L 및 500 L 발효기에서 배양 및 I.B. 추출이 완료된 R-P66 I.B.와 유가식 발효 ② (O.D.600= 100 ~ 120 induction)의 R-P66 I.B.를 refolding하였다. Refolding에 사용한 3 종의 R-P66 I.B. 중, 500 L 발효기의 R-P66 I.B.는 tubular 또는 Disk 원심분리기로 회수된 것을 사용하였다. 30 L 및 500 L 발효기의 R-P66 I.B.는 washing을 수행하지 않았으며, 2차 발효 테스트의 R-P66 I.B.는 Triton X-100 washing 및 buffer washing을 수행하였다.

각 1 g R-P66 I.B.를 20 mL의 unfolding 용액에서 가용화한 후(상온, 3 시간), 원심분리(9,000 rpm, 20 분)한 unfolded R-P66 I.B. 상층액을 400 mL의 refolding 용액¹⁵⁾에 첨가 및 배양(4°C, 3 일)하였다. 이후의 실험은 주로 30 L 발효기의 R-P66 I.B.(표준 I.B.)을 사용하여 진행하였다.

(2) Refolding 용액 구성물 농도 결정

Unfolded R-P66에 첨가되는 refolding 용액의 구성물 농도에 따른 refolding 효율 변화를 확인하기 위해 unfolded R-P66을 다양한 농도의 glycine, NaCl Tween 20 및 CaCl₂로 구성된 refolding 용액에 1:20 refolding(unfolded R-P66:refolding 용액=1:20)하였다. Refolding 용액 구성물의 농도는 다음과 같이 사용하였다: 20 또는 200 mM glycine; 0 또는 1 M NaCl, 0.05 또는 0.5% Tween 20; 20, 100, 200, 500 또는 1,000 mM CaCl₂. R-P66 활성화는 4°C, 3 일 배양으로 완료하였으며, 활성화 refolded R-P66(이하 R-P66)의 단백질 및 활성을 측정하였다.

(3) Refolding buffer 선택

5% 함량의 표준 I.B.를 3 M urea 및 10 mM mercaptoethanol 첨가된 각기 다른 buffer의 unfolding 용액에서 가용화하였다. Unfolding에 첨가한 buffer(pH 8.0)는 20 mM의 Tris-HCl,

15) 기술 노하우로 기재 안함(refolding 용액 조성)

glycine, boric acid 또는 NaHCO_3 였으며, unfolded R-P66은 unfolding 용액과 같은 20 mM buffer를 첨가한 refolding 용액에서 활성화하였다. 1:20 refolding의 R-P66 활성화는 4°C, 3 일 배양으로 완료하였으며, R-P66의 단백질 및 활성을 측정하였다.

4 종의 unfolding 및 refolding에 사용한 buffer 외에 sodium formate, sodium phosphate, sodium acetate, sodium hydrogen carbonate, sodium sulfate, trisodium citrate, ammonium citrate 또는 ammonium calcium citrate(ammonium citrate+ Ca_3 citrate)를 refolding buffer로 사용하여 1:20 refolding을 수행하였다.

(4) 보존제 후보 물질들의 auto-lysis 방지 영향

5% 표준 I.B.를 unfolding 용액에서 가용화하여 얻은 unfolded R-P66을 refolding 용액에서 1:4 또는 1:20 refolding한 후, 동일 부피의 refolding 용액, 동일 부피의 50% glycerol+50% propylene glycol 또는 동일 부피의 0 ~ 48%의 sucrose를 첨가하여 24시간 동안 4°C에서 방치하였다. 총 8회 실험으로 단백질 및 활성 변화를 측정하였다.

(5) Refolding ①

2 및 3.5 g의 표준 I.B.를 40 또는 70 mL의 unfolding 용액에 가용화한 후 urea를 제거하였다. Urea 제거는 원심분리용 30 kDa cut-off membrane을 사용하였으며, urea 제거에 사용한 buffer는 20 mM glycine(pH 8.0) 또는 refolding 용액이었다. 각 urea 농도에서 refolding을 진행하여 urea 제거 및 농축 unfolded R-P66의 회수율 및 활성을 측정하였다.

동일하게 제조한 16 mL의 unfolded R-P66 용액의 urea를 원심분리용 30 kDa cut-off membrane을 사용하여 urea 제거하였으며, 30 kDa 이하의 단백질은 3 kDa cut-off membrane으로 10배 농축하였고, 3 M 및 0.4 M urea의 unfolded R-P66의 refolding을 진행하였다. Refolding 시, R-P66의 보존제 후보물질을 0, 50 또는 100%가 되도록 첨가하였다.

2 g의 표준 I.B.를 위의 방법과 같이 가용화 및 urea를 제거하여 0.4 M urea unfolded R-P66 용액을 제조하였다. Urea 제거에 사용한 30 kDa filter는 30 kDa cut-off의 TFF Cassette였으며, 1:0 또는 1:1의 refolding을 위한 최종의 CaCl_2 농도로 조절하였다. 다양한 CaCl_2 농도에서의 R-P66 refolding에 따른 단백질량의 변화와 효소 활성을 측정하였다.

(6) Refolding ②

12 g의 표준 I.B.를 240 mL의 unfolding 용액에서 가용화한 후, 30 kDa cut-off의 TFF Cassette에서 30 kDa 이하의 단백질을 제거하였다. 240 mL의 unfolded R-P66($\times 1$ unfolded R-P66)은 refolding에 사용하거나 30 kDa TFF Cassette으로 4 배 농축($\times 4$ unfolded

R-P66)하였다. $\times 1$ unfolded R-P66을 1:1 ~ 1:4 refolding으로 활성화하거나, $\times 1$ unfolded R-P66에 CaCl_2 를 첨가하여 refolding(1:0 refolding)을 유도하였다. 또한, $\times 1$ unfolded R-P66에 CaCl_2 를 첨가한 후, sucrose, NaHCO_3 , NaCl 및 Tween 20 등을 첨가하여 refolding을 진행하였다. 위와 같은 표준 I.B.의 TFF membrane을 이용한 urea 제거를 2회 추가 실시하였다.

5. R-P66 농축

가. Ammonium sulfate 침전

제 2 절 연구방법 4. 활성화형 R-P66 생산 (6) Refolding ②의 1:0 또는 1 \times 4:0 refolding으로 획득한 R-P66을 사용하여 ammonium sulfate 침전, 원심분리용 3 kDa cut-off membrane 농축 또는 동결건조를 수행했다. Ammonium sulfate 침전은 10 mL의 R-P66을 대상으로 30, 50, 60 또는 70% 포화도가 되도록 ammonium sulfate를 첨가하여 진행하였다. 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 ammonium sulfate를 녹인 후, 원심분리(10,000 \times g, 30 분)으로 침전물과 상층액을 분리하였다. 침전물을 5 mL의 20 mM NaHCO_3 로 재가용화하여 단백질 및 효소 활성을 측정하였다.

나. 동결건조와 cut-off membrane

R-P66을 동결건조하거나 원심분리용 3 kDa cut-off membrane을 이용하여 농축하였다. 동결건조된 R-P66은 가수하여 원래의 부피로 전환하였고, cut-off membrane 농축은 7.5배 진행하였다. 동결건조 또는 농축 전의 R-P66과 농축된 R-P66은 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고, 동결건조가 완료되면 모든 효소액을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 녹인 후, 단백질 및 효소 활성을 측정하였다.

6. 보존제 탐색

가. Minitab

보존제 탐색은 표 3-2-1과 같은 1회의 중심합성 계획법, 1회의 Plackett Burman 및 4회의 Box-Behnken design을 통해 수행하였다. 보존제 후보 물질들에 대한 Plackett Burman design에서의 R-P66 잔존 활성 기여 물질들을 선별한 후, 중심합성과 Box-Behnken design를 통해 최적의 물질 조합을 예측하였다.

표 3-2-1 R-P66 보존제 탐색을 위한 Minitab design

보존제 탐색 Minitab				
Factor	Low	Center	High	고정 물질
210815 중심합성 계획법 (37℃, 5-12 일), Run=26, R ² =92.29%				
Sucrose	13.7%	20.6%	34.25%	
Betaine	7%	10.5%	14%	
Glycerol	3%	5%	7%	
Propylene glycol	3%	5%	7%	
221208 Plackett Burman (30℃, 8 일), Run=24, R ² =98.30%				
Sucrose	10 mM	50 mM	90 mM	
Glucose	5 mM	25 mM	45 mM	
Glycerol	0.5%	2.5%	4.5%	
Propylene glycol	0.5%	2.5%	4.5%	
Ammonium Ca citrate	2.5 mM	12.5 mM	22.5 mM	
APG0810/1214	0.5%	2.5%	4.5%	
Betaine	15 mM	75 mM	135 mM	
CaCl ₂	5 mM	25 mM	45 mM	
Cysteine	1.25 mM	6.25 mM	11.25 mM	
Caytine	0.05 mM	0.25 mM	0.45 mM	
221208 Box-Behnken (30℃, 7 일), Run=42, R ² =59.20%				
Glucose	20 mM	60 mM	100 mM	40 mM sucrose, 2% glycerol, 60 mM betaine, 20 mM CaCl ₂ , 15 mM cysteine, 0.2 mM caytine
Propylene glycol	2%	6%	10%	
Ammonium Ca citrate	10 mM	30 mM	50 mM	
APG0810/1214	2%	6%	10%	
221221 Box-Behnken (30℃, 7 일), Run=50, R ² =61.15%				
Propylene glycol	2.5%+	7.5%+	12.5%+	10 mM glycine
Betaine	90 mM	195 mM	300 mM	
Glycerol	2.5%+	7%+	11.5%+	
APG0810/1214	2.5%	7%	11.5%	
Ammonium Ca citrate	10 mM	17.5 mM	25 mM	
Sucrose	50 mM	90 mM	130 mM	
232104 Box-Behnken (30℃, 7-21 일), Run=52, R ² =96.48%				
Propylene glycol	10%	12.5%	15%	50 mM CaCl ₂ , 7% glycerol, 10 mM NaHCO ₃
Betaine	15 mM	60 mM	105 mM	
(NH ₄) ₂ SO ₄	35 mM	105 mM	175 mM	
APG0810/1214	8%	12%	15%	
Ammonium Ca citrate	17.5 mM	32.5 mM	47.5 mM	
Sucrose	10 mM	50 mM	50 mM	
230111 Box-Behnken (30℃, 7-28 일), Run=50, R ² =45.14%				
Propylene glycol	5%	10%	15%	50 mM CaCl ₂ , 7% glycerol, 20 mM NaHCO ₃
Betaine	15 mM	60 mM	105 mM	
Glycine	10 mM	20 mM	30 mM	
APG0810/1214	4%	8%	12%	
Ammonium Ca citrate	10 mM	20 mM	30 mM	
Sucrose	30 mM	50 mM	70 mM	

나. 보존제 테스트

Minitab의 보존제의 최적 조건 예측 결과를 토대로 표 3-2-2와 같은 9 종의 보존제 조합을 구성하여 30℃, 28 일 동안의 R-P66의 활성 변화를 추적하였다.

표 3-2-2 R-P66 보존제 후보물 조성

TEST NO.	Propylene glycol	Glycerol	Glucose	Sucrose	Betaine	APG08 10/1214	Ammonium citrate	CaCl ₂	Glycine	NaHCO ₃
1	16%	8%	100mM	40mM	60mM	10%	10mM	50mM	0M	20mM
2	18.50%	12%	0M	50mM	90mM	11.50%	25mM	50mM	0M	20mM
3	13.50%	13%	0M	50mM	95mM	7%	25mM	50mM	0M	20mM
4	18.50%	8.50%	0M	50mM	195mM	7%	17.5mM	50mM	0M	20mM
5	10%	7%	0M	50mM	57mM	8%	17.5mM	50mM	0M	20mM
6	15%	7%	0M	70mM	15mM	12%	10mM	50mM	30mM	20mM
7	15%	7%	0M	70mM	105mM	4%	10mM	50mM	30mM	20mM
8	5%	7%	0M	50mM	60mM	12%	30mM	50mM	20mM	20mM
9	10%	7%	0M	30mM	15mM	8%	30mM	50mM	20mM	20mM

7. R-P66의 산업 적용

가. 의류, 주방 또는 의료용 세척제

의류, 주방 또는 의료용 세척으로서의 R-P66의 기능 규명을 위해, Blood/Milk/Ink(Swissatest EMPA 116) 및 Egg yolk(CFT C-S-09) 오염포를 대상으로 세척 시험을 진행하였다. 비교 효소로 Novozymes사의 Savinase[®] 16L(50 mg/mL; <50% glycerol 및 <50% propylene glycol 함유)를 사용하였고, multi-enzyme은 0.2% Lipex[®] 및 0.2% Stainzyme[®] 첨가로 구성하여 단백질분해효소 단독 또는 multi-enzyme의 총 4 종의 시료를 제작하였다(Table 3-2-3). 한국의류시험연구원 의뢰로 진행한 시험은 KS M 2709:2006 8.1(120 rpm, 10 분 세척 후 3 분 2 회 행균)의 방법으로 3 L의 25±1℃ 물에서 시료의 다양한 희석(1:50 ~ 1:200)으로 진행되었으며, 각 오염포에 대한 3회 반복시험으로 오염포 세척 전후의 오염포 반사율을 측정하여 백색도를 다음과 같이 계산하고 세척력을 평가하였다:

$$\text{백색도} = 100 - \sqrt{((100 - L)^2 + a^2 + b^2)}$$

$$\text{세척력}(\%) = [(\text{세탁 후 백색도} - \text{세탁 전 백색도}) \div (\text{원포 백색도} - \text{세탁 전 백색도})] \times 100$$

표 3-2-3 효소액 조성

효소액 1	효소액 2	효소액 3	효소액 4
80 mg R-P66	80 mg Savinase [®] 16L	80 mg R-P66	80 mg Savinase [®] 16L
0.8 mL Lipex [®] , 0.8 mL Stainzyme [®]		-	
60 mL Glycerol, 60 mL Propylene glycol			
20 mL 1 M Buffer (pH 8.0)			
Total: 400 mL			
오염포: Blood/Milk/Ink, Egg yolk, Blood (25°C)			
1:200, 1:100, 1:50	1:100, 1:50	1:200, 1:100, 1:50	1:100, 1:50

나. 분자진단

(1) DNA 추출

E. coli DH5a를 LB 액체배지에서 배양(37°C, 4 시간)한 후, iNtRON 사의 G-spinTM Genomic Extraction Kit와 Bioneer 사의 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit를 사용하여 *E. coli* gDNA를 추출하였다. 각 Kit의 proteinase K(이하 PK)의 양을 조절하거나, PK를 대체한 R-P66 사용으로 다양한 온도에서 추출된 gDNA를 agarose 전기영동과 nanodrop으로 확인하였다. Mouse liver tissue 및 미국산 소고기 조직의 DNA 추출은 Biofactories 5 min Tissue DNA Extraction Kit를 사용하여 진행하였으며, Kit 내 PK의 양을 조절하거나, PK를 대체한 R-P66 사용으로 다양한 온도에서의 R-P66에 의한 gDNA 추출능을 평가하였다.

(2) RNA 추출

Mouse mammalian cell 및 *E. coli* DH5a의 RNA 추출은 Trizol 사용 매뉴얼 방법, Qiagen사의 RNA Extraction Kit, TaKaRa사의 Viral RNA Extraction Kit 및 Bioneer사의 AccuPrep[®] Viral RNA Extraction Kit를 사용하여 진행하였다. 다양한 방법에서 PK 또는 R-P66을 첨가하거나 첨가량을 조절하여 추출한 RNA를 agarose 전기영동으로 확인하였다.

(3) 분자진단

Mouse mammalian cell의 total RNA를 Trizol을 이용하여 추출하였다. 분자진단은 qRT-PCR 결과를 토대로 판단하였는데, 증폭 정량 대상은 일반적인 housekeeping gene인 GAPDH로 선발했으며, 증폭을 위한 프라이머는 다음과 같이 구성하였다:

Forward(T_m=63.5°C): 5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGGCT-3'

Reverse(T_m=65.1°C): 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'

BioLabs Luna[®] Universal One-Step RT-qPCR Kit에 1 ug의 mouse total RNA와 프라이머를 첨가하고 진행한 실시간 증합효소 연쇄반응에서 ethanol, PK 또는 R-P66을 첨가하여 증폭의 변화를 확인하였다.



제 3 절 연구 결과

1. R-P66 생산을 위한 발효

가. 유가식 발효 ①

(1) 발효 테스트

유가식 발효 ①의 발효 배지를 이용한 R-P66 함유 E. coil BL21 (DE3)에 대한 발효를 수행하였다. Air를 3.0 LPM(약 1 VVM)으로 고정된 약 7 시간 발효(O.D.600nm = 14.2)에서 초기 발효 배지 내 당이 모두 소모되며 재조합 대장균이 성장하였다. 당 소모에 따른 Feeding 배지 주입(약 42 mL/h)으로 약 14 시간 배양에서 O.D.600nm = 42로 최대 성장을 보였으나, 배지 내 당의 축적(발효 종료 시 약 3.9 g/L 검출)으로 대장균은 사멸기로 진입하였다.

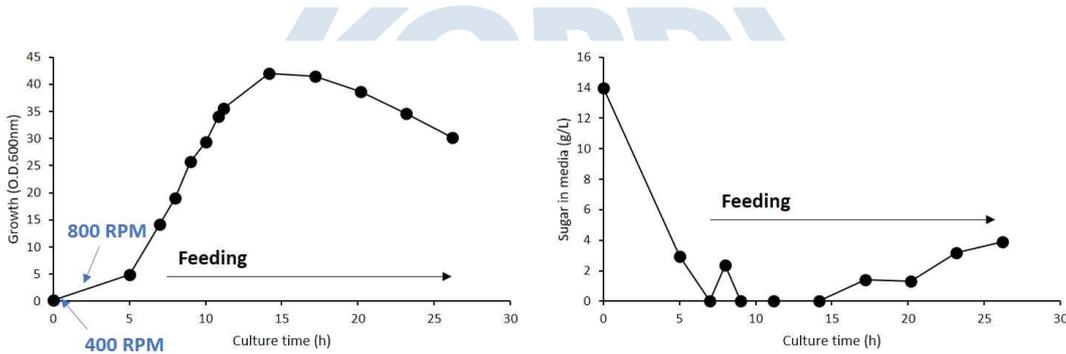


그림 3-3-1. 유가식 발효 ①의 테스트 발효

(2) 대장균의 당 이용능 개선

일반적으로 대장균 발효에서 glucose는 고효율의 대장균 성장 에너지원이지만, 배지 내 일정 농도 이상의 glucose 축적은 acetic acid로의 전환을 유도하여 pH 변화, 성장 억제 및 단백질 합성 저해의 원인이 된다. 이를 극복하는 방안 중 하나는 thiamine-HCl 첨가로, 이 물질은 대장균의 당 대사에 필요한 것으로 알려져 있다. Feeding 배지 내 고농도 glucose에 대한 재조합 대장균의 이용이 원활하도록, 초기 발효 배지와 Feeding 배지의 thiamine-HCl를 100 mg/L로 변경하였다. 발효 동안 pH 6.9 ~ 7.0을 유지하였으며, agitation speed(150 ~ 800 rpm)와 air(1-5 LPM)는 DO와 연동하여 조절하였다(그림 3-3-2 및 3-3-3).

약 8.4 시간 발효에서 초기 발효 배지 내 당이 모두 소모되었고, O.D.600nm = 16.6으로 재

조합 대장균이 성장하였다. 당 소모에 따른 Feeding 배지 주입(약 25 mL/h)으로 약 25.5 시간 배양에서 O.D.600nm = 122로 최대 성장을 보였으며, 배지 내 당 대부분은 대장균의 에너지원으로 사용되었다.

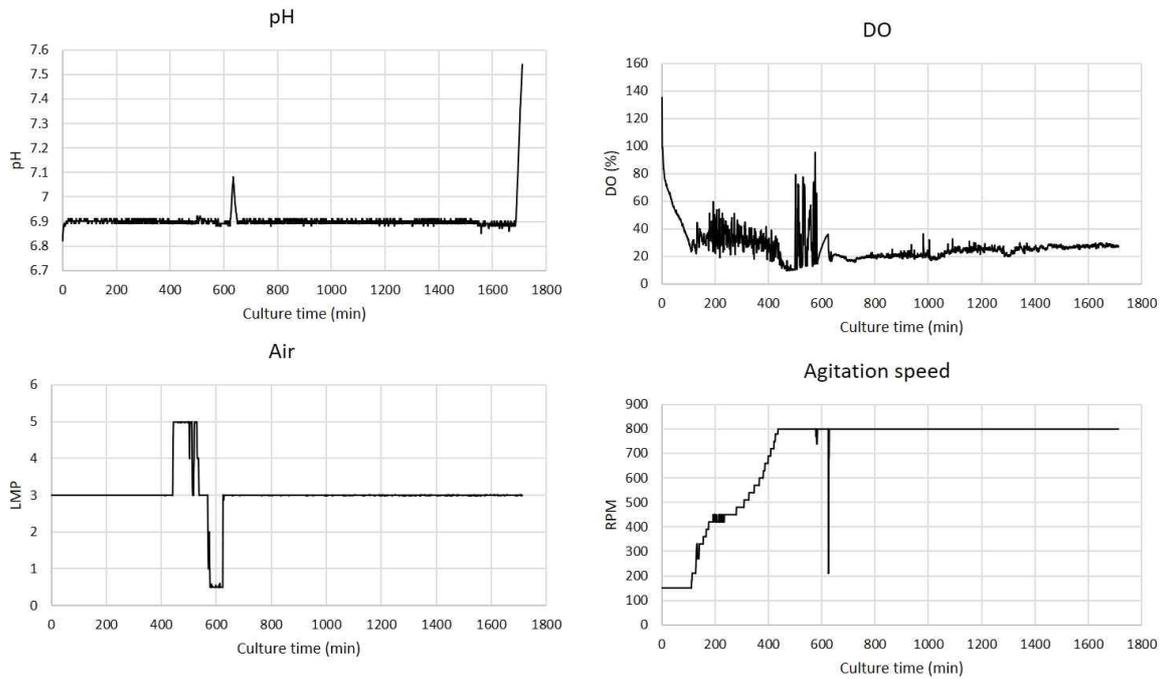


그림 3-3-2. 발효 동안의 pH, DO, air 및 agitation speed

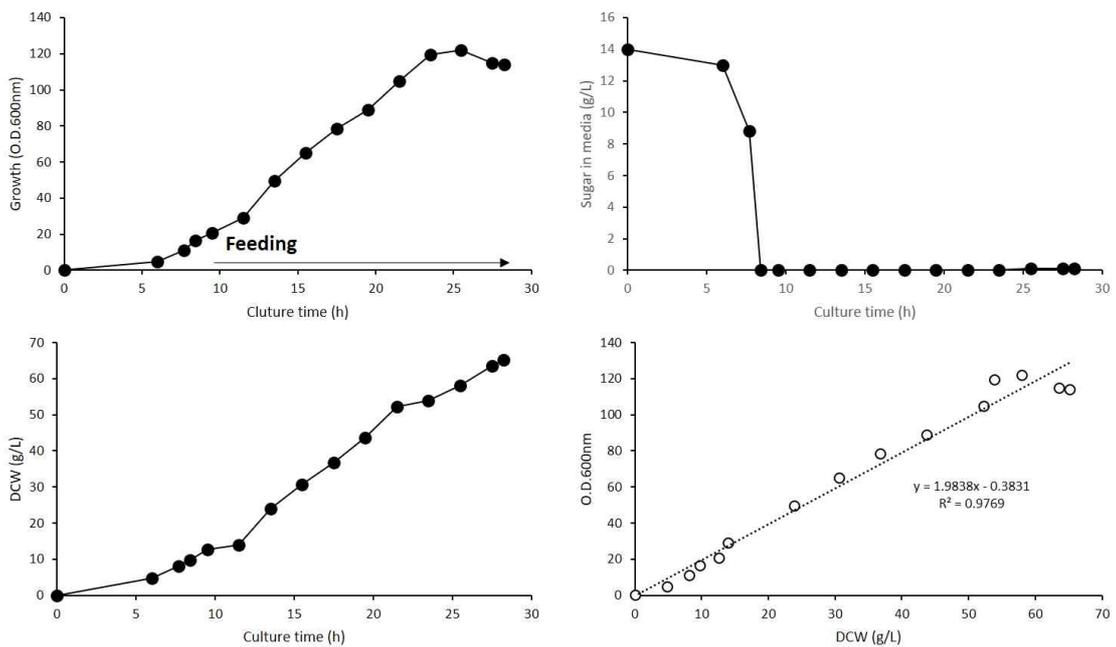


그림 3-3-3. Thiamine-HCl 공급에 따른 재조합 *E. coli*의 성장

비록, Thiamine-HCl 함량 조절로 고농도의 glucose가 함유된 Feeding 배지 주입, 재조합 대장균의 성장 및 glucose 이용률을 조절할 수 있었지만, 총 Feeding 배지의 주입량 또는 주입 속도를 높일 수 없었다. Feeding 배지의 주입량, 주입 속도와 glucose 이용을 조절할 수 있으면, 효율적인 고밀도 발효 배양이 가능할 것으로 판단된다. 따라서, Feeding 배지의 주입량 증가와 glucose 대사를 원활히 하기 위해, 0.1 g/L thiamine-HCl 하에서 산소를 주입하며 발효를 수행하였다(그림 3-3-4). 2 회의 발효 시험 모두 초기 발효 배지 내 glucose가 감소하는 시점에 Feeding 배지를 주입하였으며, Feeding 배지의 주입 속도는 pH와 DO의 변화에 따라 대응·변경하였다. 211123 및 211125 batch의 feeding 유속은 0.22 ~ 0.5 mL/min 및 0.3 ~ 2.3 mL/min이었으며, 두 batch 모두 약 605 mL의 Feeding 배지가 주입되었다. 211123 batch는 0.1 g/L thiamine-HCl에 의해 O.D.600nm = 60으로 당을 이용하여 성장을 유지하지만, 11 ~ 12 시간 배양부터 acetic acid가 배지 내에 쌓이며 pH는 급격히 하락하였다. 211125 batch는 211123 batch에 비해 빠른 Feeding 배지 주입을 수행하여 11 시간의 발효까지 높은 성장 속도를 보여 짧은 시간 내에 O.D.600nm = 88에 도달하였다. 하지만, 211123 batch와 마찬가지로 최대 성장 후 acetic acid가 배지 내에 쌓이는 것이 확인되었다. 결국, Thiamine-HCl 및 산소 주입의 조건에서도 Feeding 배지의 주입 속도를 조절하거나, glucose 외의 다른 영양분이 추가되어야 Feeding 배지의 주입량 증가 및 고밀도 발효 배양이 가능할 것으로 판단된다.

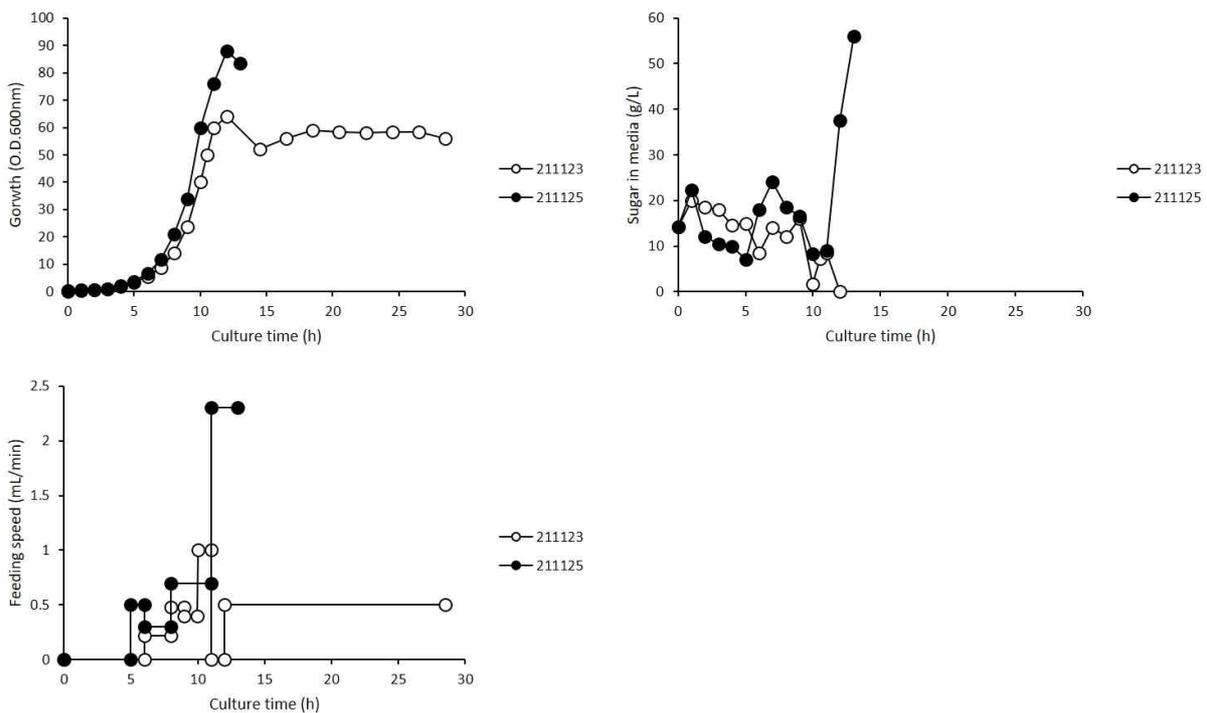


그림 3-3-4. 산소 공급에 의한 재조합 *E. coli*의 성장

(3) Yeast Extract 첨가

Yeast Extract는 대장균의 당 대사에서 acetic acid 형성을 억제하며, 재조합 단백질 생산에 도움을 준다. 100 mg/L thiamine-HCl이 함유된 배지를 사용한 211109 및 211116 batch 모두는 Feeding 배지의 첨가에서 당의 축적이 발견되지 않았다(그림 3-3-5). 211109 batch는 약 17 시간의 배양 동안 약 240 mL의 Feeding 배지가 첨가되어 O.D.600nm = 105로 성장하였으며, 이 시점에 Feeding 배지의 주입을 멈추고 0.5 mM IPTG와 9.6 g yeast extract를 첨가하여 R-P66 생산을 유도하였다. 211116 batch는 약 140 mL의 Feeding 배지 첨가로 약 17 시간의 배양에서 O.D.600nm = 47로 대장균이 성장하였으며, 이 시점에 Feeding 배지를 Feeding 배지 B[40 g/L yeast extract, 300 g/L glucose, 1 g/L MgSO₄-7H₂O, 1.5 g/L (NH₄)₂HPO₄]로 변경하였다. 500 mL Feeding 배지 B 주입과 0.5 mM IPTG 첨가로 211116 batch의 최대 성장 O.D.600nm = 90으로 측정되었다. 두 batch 모두는 적절한 Feeding 배지의 주입 하에서 배지 내 당 소모가 확인되었으나, IPTG가 첨가에 의한 재조합 R-P66 생산이 확인되지 않았다.

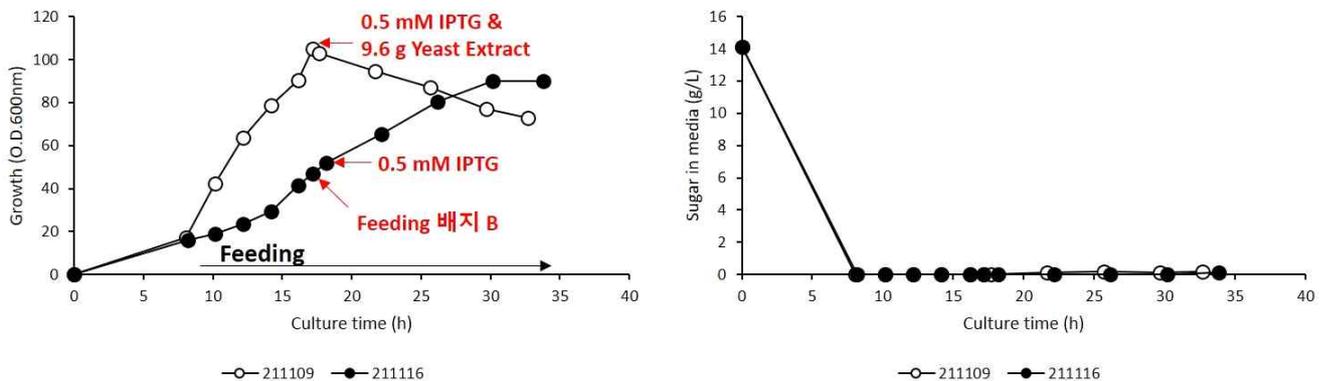


그림 3-3-5. Yeast extract 공급에 의한 재조합 *E. coli* 성장

(4) R-P66 생산을 위한 발효 최적화

Yeast extract를 초기 발효 배지와 Feeding 배지 각각에 10 g/L 및 40 g/L 첨가하여 발효 배지를 제작하였으며, 초기 발효 배지의 MgSO₄-7H₂O를 3.5 g/L로, Feeding 배지의 glucose를 564 g/L로 조절하였다(최종 사용량: 251 g/L glucose, 24 g/L yeast extract, 7 g/L MgSO₄-7H₂O). 그림 3-3-6과 같은 2 회에 독립된 발효 모두는 5.0 LPM air와 0.5 LPM O₂ 주입 하에서 진행되었으며, O.D.600nm = 90 ~ 106의 성장 시점에 0.5 mM IPTG는 첨가되었다. 약 30 시간의 발효로 재조합 대장균은 O.D.600nm=275 ~ 281로 성장하며 R-P66 I.B.를 생산하였다(그림 3-3-7). 발효의 종료 시까지 발효 배지 내 당은 모두 사용되었으며, Feeding 배지는 1,050 ~ 1,057 mL 부피가 주입되었다. 이를 통해, feeding 주입량 증가와 배지 내 당 이용률 증

가에 따른 고밀도 발효 방법 확립 및 R-P66 대량 생산법이 확인되었다.

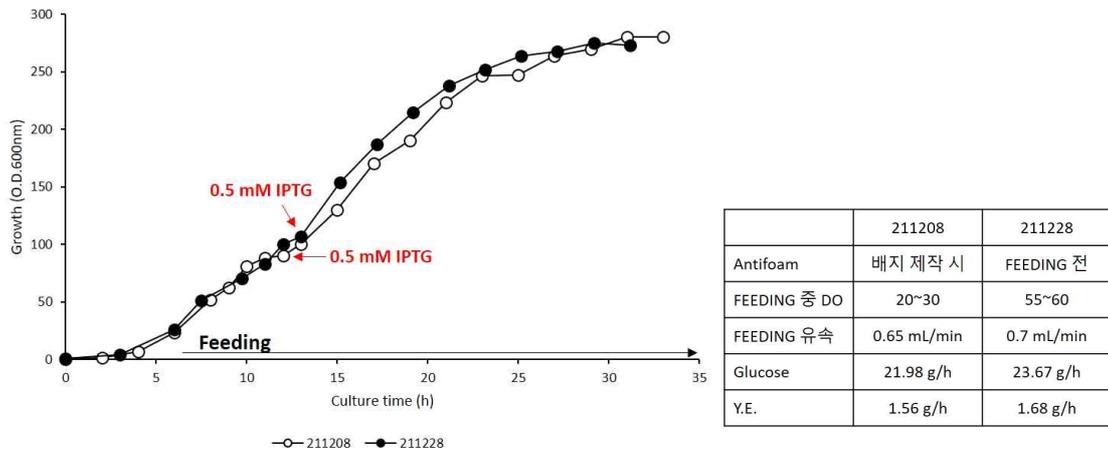


그림 3-3-6. 유가식 발효 ①의 최적화

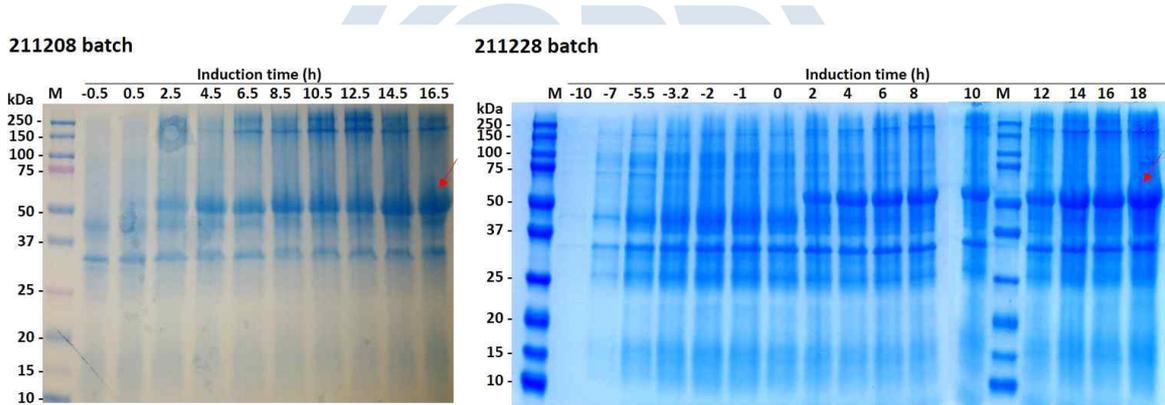


그림 3-3-7. 최적화한 유가식 발효 ①에서의 R-P66 I.B. 생산

나. 유가식 발효 ②

(1) 발효 테스트

유가식 발효 ①을 통해 재조합 대장균의 고밀도 배양 및 단백질 생산을 확인하였다. 유가식 발효 ②는 미량 금속 이온의 구성 변경, glucose 및 yeast extract 첨가량 변경 등으로 유가식 발효 ①과 구분된다. 총 3회의 독립된 발효 테스트는 400 ~ 800 rpm agitation speed, 3.0 ~ 4.5 LPM air 및 0.0 ~ 0.5 LPM O₂에서 진행되었다(그림 3-3-8). 약 6 시간의 재조합 대장균 발효로 초기 발효 배지 내 당은 모두 소모되며 세균이 성장하였고(O.D.600nm = 12 ~ 15),

Feeding 배지 주입에 따라 성장률(최대 성장률 = 18 ~ 25 u/h)이 증가하였다(그림 3-3-9). 최대 성장(O.D.600nm = 약 80) 시점에 첨가한 0.53 ~ 0.8 mM IPTG에 의한 재조합 단백질 생산 기간 동안 배지 내 당은 약 1.7 g/L 이하로 측정되었으며, IPTG 첨가량에 따른 단백질 발현 차이를 확인할 수는 없었다(그림 3-3-10). 발효 종료까지 약 1 L의 Feeding 배지가 주입되었으며, 최대 생장은 O.D.600nm = 105 ~ 108에 도달하였다. 발효 종료까지 142 g/L glucose, 18 g/L yeast extract 및 1.5 g/L MgSO₄·7H₂O가 사용되어, 유가식 발효 ①의 최적화 대비 56.4, 74.1 및 44.1%의 glucose, yeast extract 및 MgSO₄·7H₂O 사용량의 발효가 완료되었다.

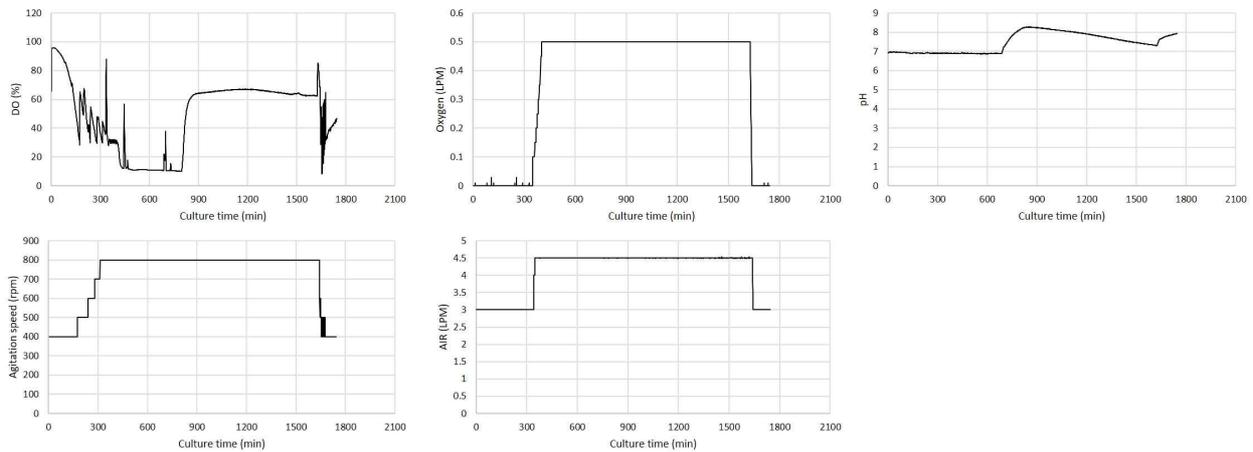


그림 3-3-8. 유가식 발효 ②의 테스트 발효에서의 pH, O₂, DO, air 및 agitation speed 변화

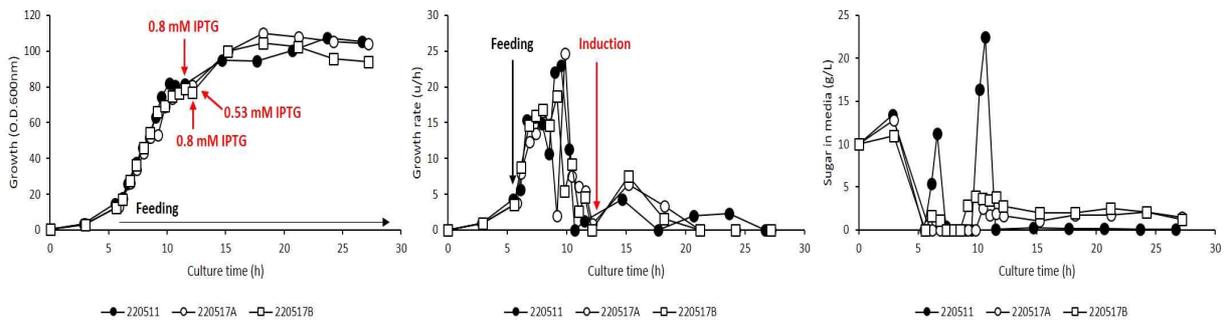


그림 3-3-9. 유가식 발효 ② 테스트 발효에서의 재조합 대장균 성장

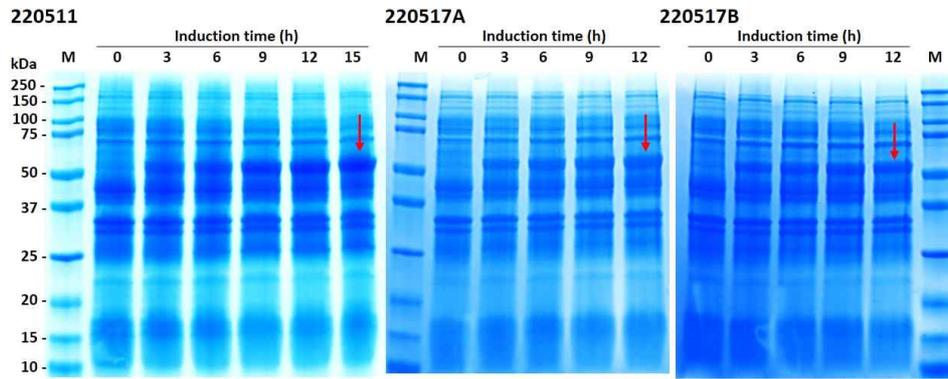


그림 3-3-10. 유가식 발효 ② 테스트 발효에서의 R-P66 I.B. 생산

(2) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 조절

Feeding 배지 주입 및 IPTG 첨가 후의 성장률이 감소하는 것을 해결하기 위해, Feeding 배지의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 조절하였다. 또한, feeding의 방법을 continuous(220525A batch) 또는 30% DO STAT(220525B batch)으로 구분하여 사용하였다. 400 ~ 800 rpm agitation speed, 3.0 ~ 4.5 LPM air 및 0.0 ~ 0.5 LPM O_2 에서 진행한 continuous 및 DO STAT feeding 모두에서 배지 내 glucose는 약 0.3 g/L 이하였으며 특히, DO STAT feeding에서 배지 내 glucose 양은 0.1 g/L 미만으로 유지되었다(그림 3-3-11 및 3-3-12). 하지만, DO STAT feeding(15.5 시간, O.D.600nm = 95)은 continuous feeding과 비교하여 느린 Feeding 배지 주입으로 재조합 대장균 성장 속도 또한 continuous feeding(13.5 시간, O.D.600nm = 99)의 경우보다 느렸다. Continuous 및 DO STAT feeding에서의 0.67 mM IPTG 첨가 후 최대 성장 속도는 23 및 19 u/h였으며, 각 feeding 조건의 최대 성장 O.D.600nm은 230 및 200이었다. Continuous feeding으로 251 g/L glucose, 11 g/L yeast extract 및 5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 사용되었으며, DO STAT feeding은 212 g/L glucose, 9 g/L yeast extract 및 4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 사용되었다. Feeding 방법을 달리한 두 발효로 유가식 발효 ② 테스트 batch 대비 2.0 ~ 2.3 배 높은 성장을 확인하였고, R-P66 I.B. 생산량 또한 증가한 것을 확인하였다(그림 3-3-13).

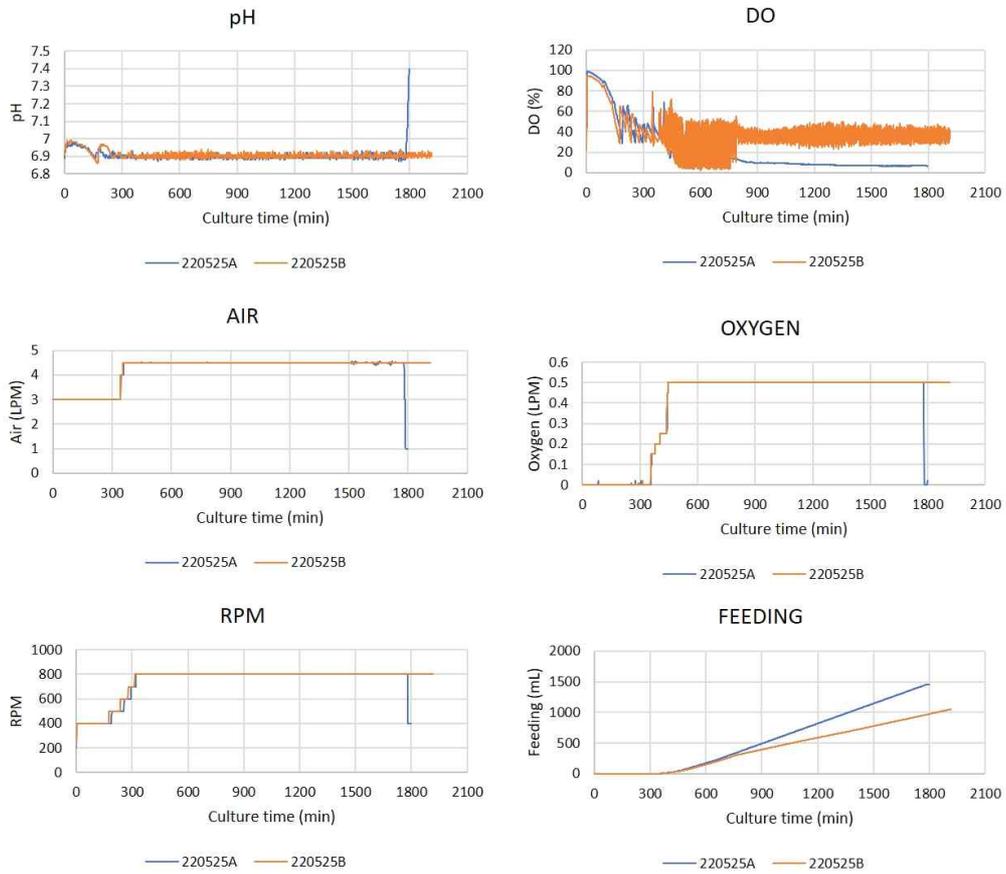


그림 3-3-11.

MgSO₄·7H₂O 조절 유가식 발효 ②에서의 pH, O₂, DO, air, feeding speed 및 agitation speed 변화

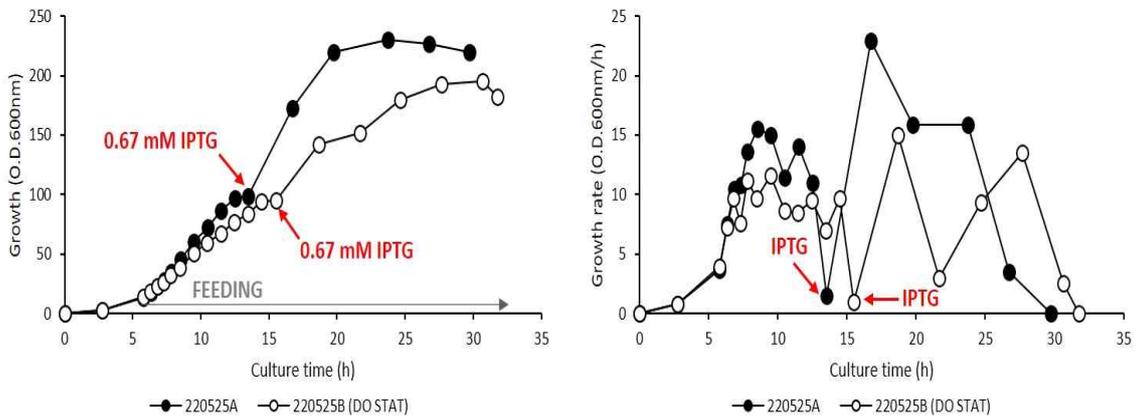


그림 3-3-12. MgSO₄ 또는 feeding 속도를 조절한 재조합 *E. coli* 발효

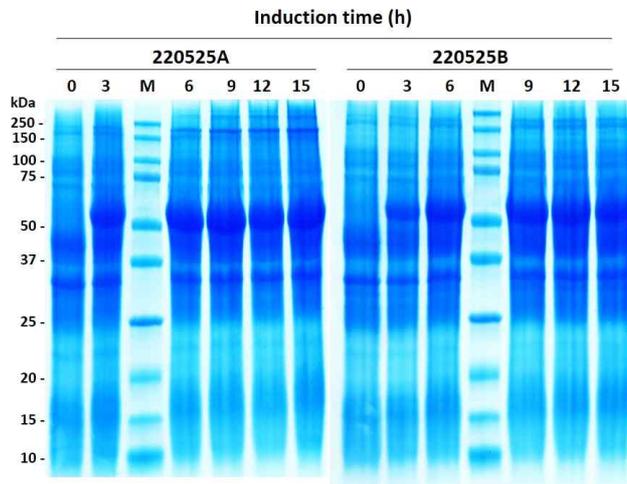


그림 3-3-13. $MgSO_4$ 또는 feeding 속도를 조절한 발효에서의 R-P66 I.B. 생산

(3) Feeding speed 조절

pH STAT 또는 DO STAT에 의한 Feeding 배지 주입은 발효 시간이 늘어나는 단점을 갖고 있다. 이를 극복하기 위해, feeding speed를 조절하였다(그림 3-3-14 및 3-3-15). 빠른 Feeding 배지 주입은 재조합 대장균의 glucose 이용에 제한을 주기 때문에, Feeding 배지 내 yeast extract 양을 조절하였다. 1 mL/min 이상의 feeding speed는 발효에 문제를 일으켰으며, Feeding 배지 내 yeast extract의 양에 따라 성장 정도가 결정되는 것을 확인하였다. 30 g/L yeast extract를 주입하면 13.6의 발효 시간 내에 O.D.600nm = 124로 성장하지만, 25 g/L의 yeast extract 주입과 마찬가지로 induction에 문제(약한 발현)가 발생하였다(그림 3-3-16). 이는 최대 air, O_2 및 agitation speed 조건에서도 일정 DO를 유지할 수 없어서 발생된 발효 후반부의 glucose 배지 내 축적에 의한 것으로 판단된다.

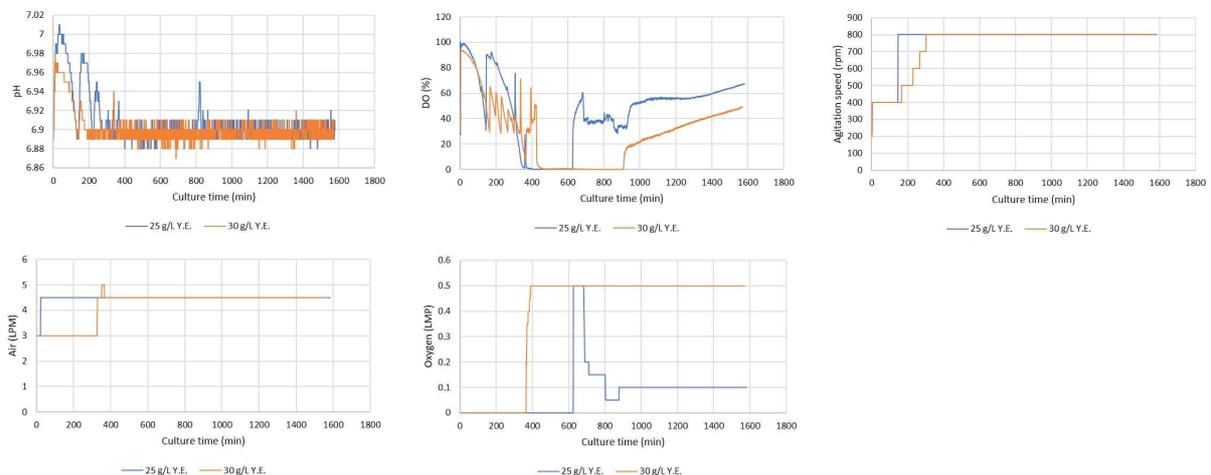


그림 3-3-14. Feeding speed 조절 발효에서의 pH, O_2 , DO, air 및 agitation speed 변화

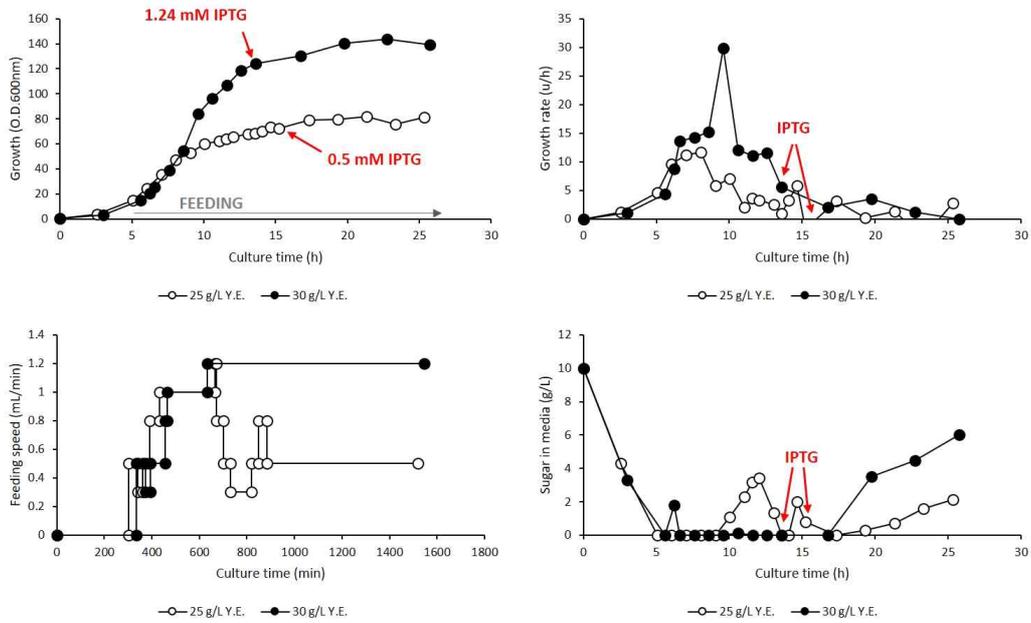


그림 3-3-15. Feeding speed 조절 발효에서의 재조합 *E. coli* 성장

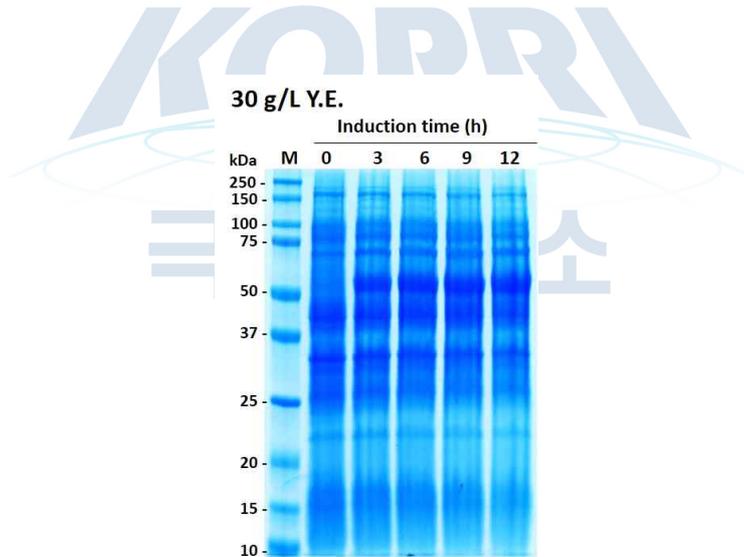


그림 3-3-16.

Feeding speed 조절에 의해 30 g/L yeast extract가 제공된 발효에서의 R-P66 LB. 생산

(4) R-P66 생산을 위한 발효 최적화

Feeding 속도를 증가시키기 위해, yeast extract의 농도를 고정하고 4.0 LMP air, 1.0 LPM O₂ 및 800 rpm agitation speed에서 수행한 발효는 최대 feeding 유속 1.4 mL/min에서도 glucose 축적은 발생하지 않았다(그림 3-3-17 및 3-3-18). O.D.600nm = 65 및 128에서 수행한 IPTG induction으로 최대 성장 O.D.600nm = 213 및 242를 기록하는 고밀도 배양 발효 최적화

가 이루어졌다. IPTG induction 후 최대 생장률은 약 29 u/h였으며, DO는 20 ~ 50%를 유지하였다. 2 회의 발효 동안 Feeding 배지는 1.2 ~ 1.5 L가 소진되어 최종적으로 180 ~ 241 g/L glucose, 10 ~ 13 g/L yeast extract 및 3.7 ~ 4.5 g/L MgSO₄-7H₂O가 사용되었다. R-P66의 과발현 또한 확인하여 2차 발효 최적화를 완료하였다(그림 3-3-19).

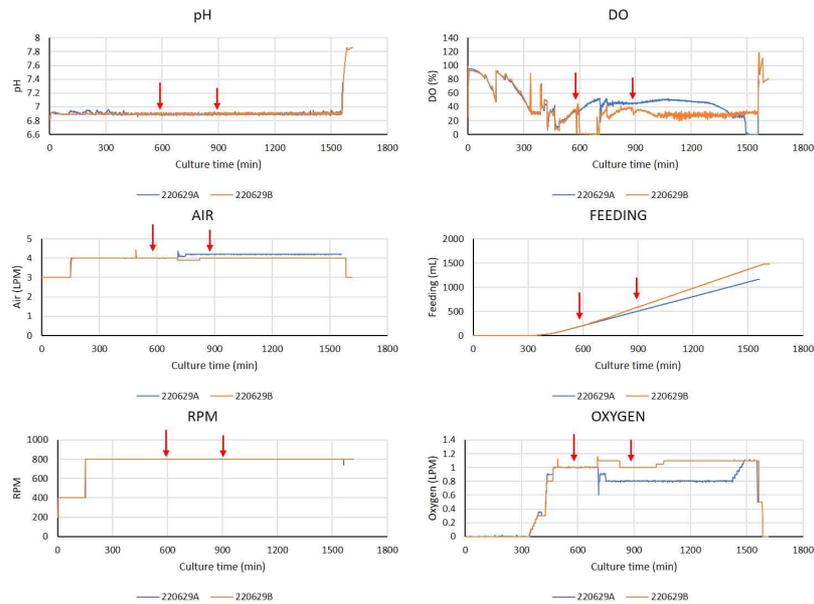


그림 3-3-17.

최적화된 유가식 발효 ②에서의 pH, O₂, DO, air, feeding speed 및 agitation speed

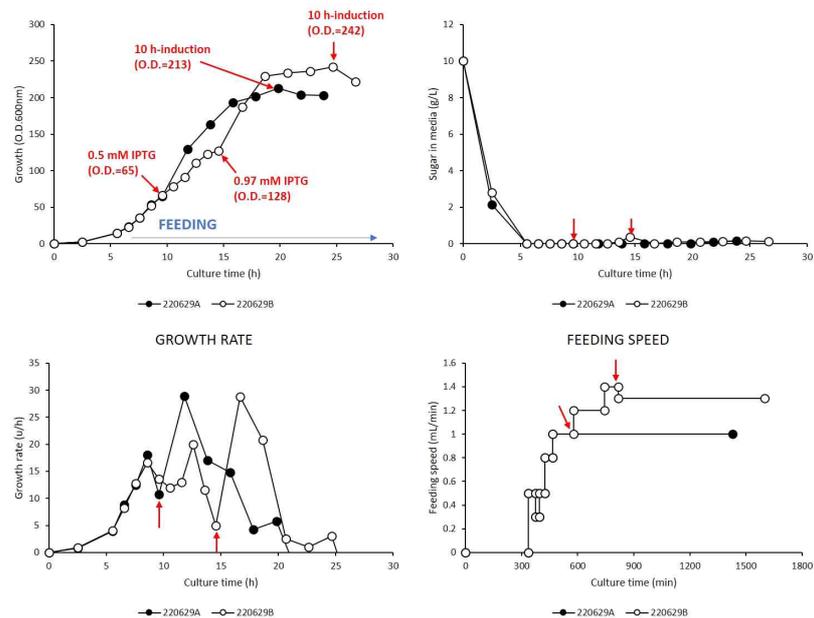


그림 3-3-18. 최적화된 유가식 발효 ②에서의 재조합 대장균 성장

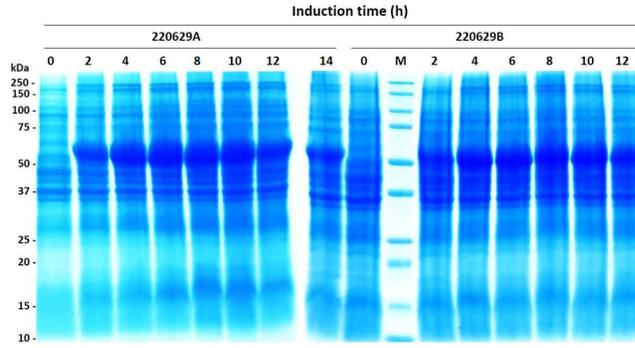


그림 3-3-19. 최적화한 유가식 발효 ②에서의 R-P66 I.B. 생산

다. 유가식 발효 ③

(1) 발효 테스트

유가식 발효 ① 및 ②는 발효 최적화를 위해 산소 공급이 필요하다. 산소 공급이 없을 때의 발효를 위한 재조합 대장균에 대한 유가식 발효를 수행하였다. 3.0 LPM air 및 pH 6.9 ~ 7.0을 유지한 상태에서 산소 없이 agitation speed(최대 800 rpm) 만을 조절한 발효를 수행하였다(그림 3-3-20). 약 5 ~ 6 시간의 발효로 초기 발효 배지 내 glucose가 모두 소모되면(O.D.600nm = 17 ~ 23), Feeding 배지를 continuous feeding으로 주입하였다(그림 3-3-21). 총 3 회의 발효 테스트 모두에서 발효 배지 내 당은 모두 소모되었다. O.D.600nm = 60에서 0.5 ~ 1.0 mM IPTG를 첨가하면(그림 3-3-21의 211006 및 211019 batch), 최대 성장 O.D.600nm = 106이었으며, 이 시점에서 IPTG 첨가 농도에 의한 차이는 없었다. 211006 및 211019 batch 보다 이른 시기의 0.5 mM IPTG induction(O.D.600nm = 49)을 수행한 220209 batch의 최대 성장 O.D.600nm = 125로 induction 시기에 따른 재조합 대장균의 성장 차이를 확인하였다. 220209 batch의 induction 후 최대 성장률은 약 12 u/h로 late induction(211006 및 211019 batch = 5 ~ 7 u/h) 보다 높은 성장률을 보였다. R-P66 생산력 또한 O.D.600nm = 49 induction에서 다른 2 회의 late induction의 경우보다 뛰어난 것을 SDS-PAGE 분석으로 확인하였다(그림 3-3-22).

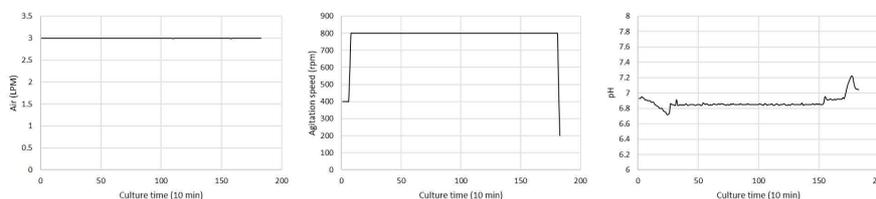


그림 3-3-20. 유가식 발효 ③ 테스트 발효의 pH, air 및 agitation speed

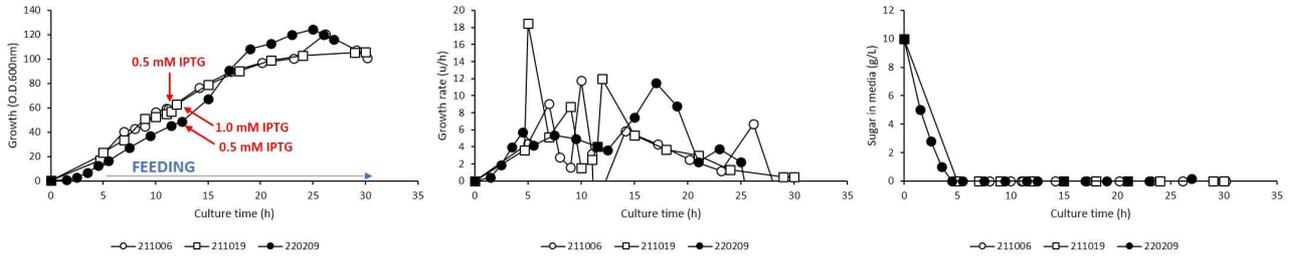


그림 3-3-21. 유가식 발효 ③ 테스트 발효에서의 재조합 대장균 성장 및 다양한 성장 시점에서의 IPTG induction

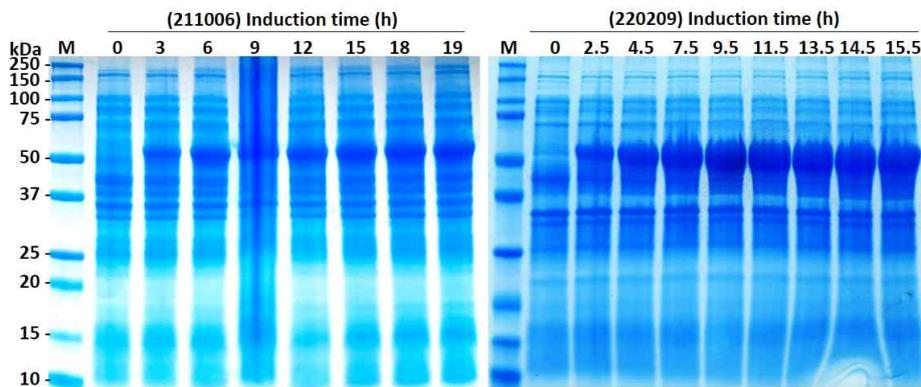


그림 3-3-22. 유가식 발효 ③ 테스트 발효에서의 R-P66 I.B. 생산

(2) Glucose 조절

유가식 발효 ① 및 ②와 같은 고밀도 배양을 위해, Feeding 배지의 glucose, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 thiamine-HCl을 각각 350 g/L, 2 g/L 및 50 mg/L로 변경하였다. 그림 3-3-24와 같은 발효 조건 3.0 LPM air 및 pH 6.9 ~ 7.0, 최대 800 rpm agitation 및 산소 미공급 하에서 수행한 발효에서, 약 5 시간 배양으로 초기 발효 배지 내 glucose는 모두 소모되었다(O.D.600nm = 10 ~ 21, 그림 3-3-23). Feeding은 continuous(220329 batch) 또는 pH/DO STAT(220413 batch) 방법으로 진행하였다. 0.75 mL/min 유속으로 진행한 continuous feeding에서 재조합 대장균은 9.5 u/h의 최대 성장률로 성장하였지만, 발효 13 시간부터 acetic acid가 배지 내에 축적되었고 IPTG 첨가에 의한 R-P66 생산 또한 이루어지지 않았다. 결국, 220329 batch에서 당 축적(1.3 ~ 3.4 g/L, 17-26 시간 발효)이 발생하였고, 대장균은 사멸하였다.

재조합 대장균의 Feeding 배지 내 고농도 glucose 사용은 STAT feeding으로 해결하였다(220413 batch). pH 및 DO STAT feeding은 220329 batch보다 느린 Feeding 배지 주입(약 25 mL/h)으로, 재조합 대장균의 성장 저해가 발생하지 않지만, 약 41 시간의 발효 시간을 요구하

는 단점이 있었다. 221413 batch의 최대 O.D.600nm = 122(induction 후 최대 성장률 = 4.5 u/h)였으며, IPTG에 의한 R-P66 생산을 확인하였다.

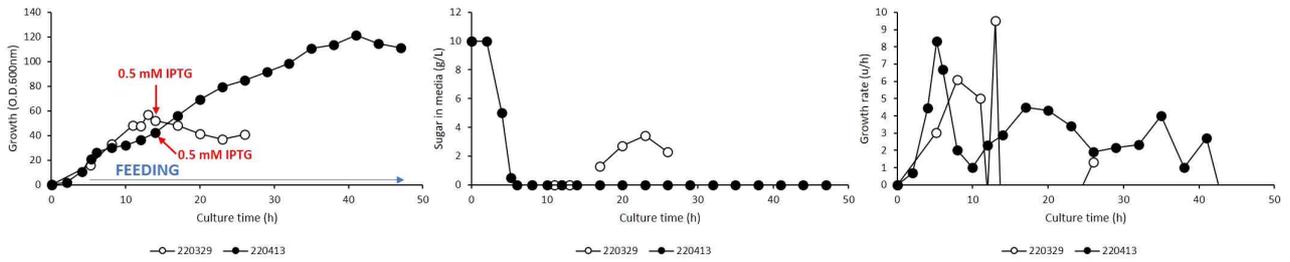


그림 3-3-23. 고함량 glucose에서 feeding 조절에 따른 재조합 대장균의 성장

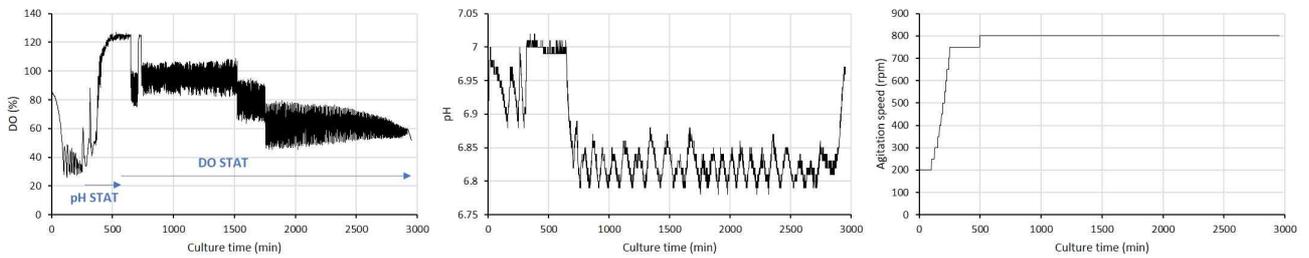


그림 3-3-24. 220413 batch의 DO, pH 및 agitation speed

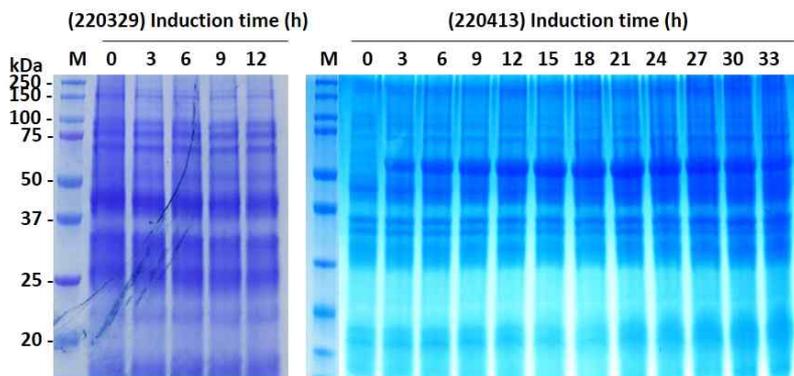


그림 3-3-25. 고함량 glucose에서 feeding 조절한 발효에서의 R-P66 I.B 생산

(3) R-P66 생산을 위한 발효 최적화

산소를 사용하지 않는 발효는 발효기 사용 여건과 관련되며, 상용화 생산용 발효기를 임대 사용하는 것을 고려한 발효 조건이다. 30 ~ 5,000 L 발효기는 발효기 용량의 약 50% 이상의 초기 발효 배지가 필요하다(예, 500 L 발효기의 최소 초기 발효 배지 = 250 L 이상). 보통 발

효기 용량의 70%를 초과하는 부피의 발효는 거품 발생 등의 문제 때문에 수행되지 않으므로. 이를 해결하기 위해서는 Feeding 배지를 농축 사용해야 한다. 이를 확인하는 발효 최적화를 5 L 발효기에서 수행하였다. Feeding 배지를 기존 배지의 2 배 농축액으로 제조 사용(0.7 L)한 2 회기의 발효 모두는 산소를 사용하지 않았으며, 종 배양액 접종량, glucose 및 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의 양 그리고 사용 trace metal에서 변화를 주며 발효(220726 및 220914 batch)를 수행하였다. 두 발효 동안 산소 주입 없이 약 20% 이상의 DO가 유지되었으며, 두 발효의 최대 O.D.600nm=156-161 이었다(그림 3-3-26 및 3-3-27).

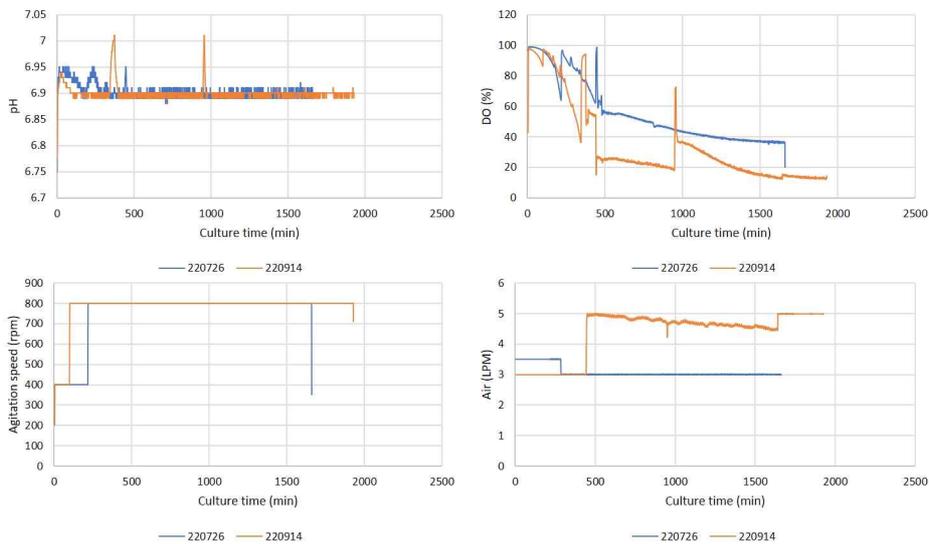


그림 3-3-26. 220726 및 220914 batch의 pH, DO, air 및 agitation speed

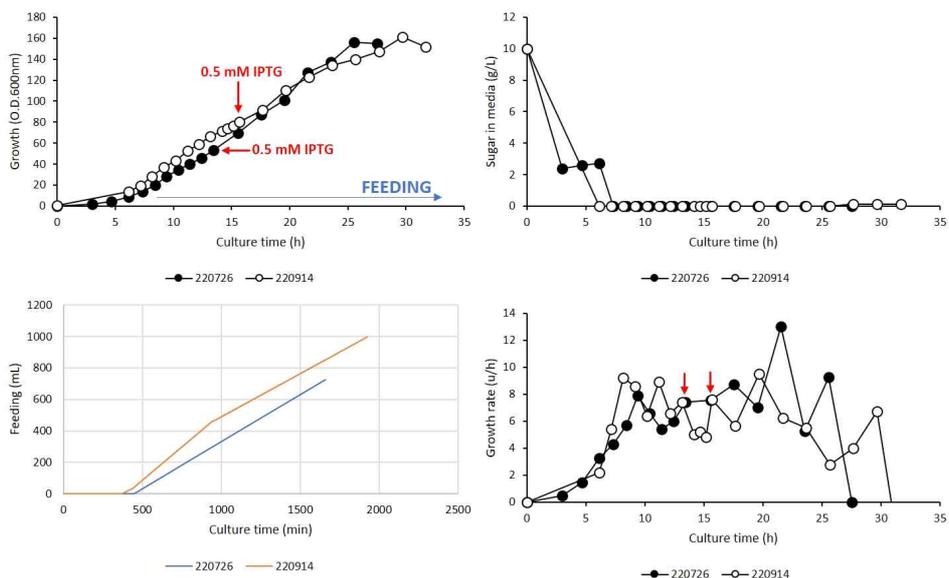


그림 3-3-27. 220726 및 220914 batch의 재조합 대장균 성장과 feeding 속도

220726 및 220914 batch의 induction 후 최대 성장률은 13 및 9.5 u/h였으며, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의 양 그리고 사용 trace metal의 차이에 따른 차이를 확인할 수 없었다. 두 발효의 차이는 IPTG induction 시점에서 나타났는데, PTG induction을 O.D.600nm = 약 53에 수행하는 것이 재조합 대장균의 성장 및 R-P66 생산에 유리한 것을 확인하였다(220726 batch, 그림 3-3-26 및 3-3-27). 단백질 생산 측면에서, 2207126 batch는 약 760 mL의 Feeding 배지 사용(220926 batch = 약 1,000 mL), 25.5 h 배양 시간(220926 batch = 약 30 시간), 적은 glucose 및 air 사용(3.0 LPM; 220914 batch = 5.0 LPM)의 장점이 확인되었으며, R-P66의 생산량 또한 220914 batch보다 높았다

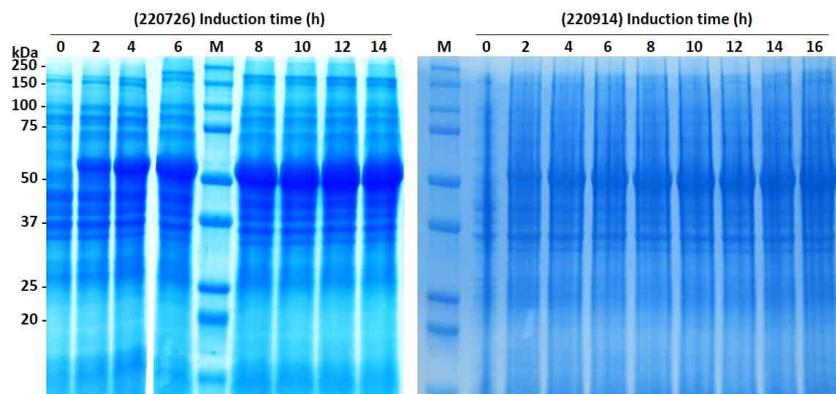


그림 3-3-28. 220726 및 220914 batch의 R-P66 I.B. 생산

라. R-P66 생산을 위한 상용화 발효

R-P66 생산을 위한 상용화 발효는 한국생명공학연구원 오창 및 전북 분원 내 30, 500 및 5,000 L 발효기에서 수행하였다(그림 3-3-29, 3-3-30 및 3-3-31). 30 L 발효의 종배양은 LB 액체배지의 flask에서 진행하였으며, 500 및 5,000 L 발효 종배양은 20 및 200 L의 LB 액체배지 발효(36°C, 1 VVM air, 100 rpm agitaion)로 진행하였다. 30, 500 및 5,000 L 발효에서 최대 air는 20, 40 및 1,350 LPM이었으며, 최대 agitation speed는 310, 250 및 100 rpm이었다. 산소를 사용하지 않는 조건에서 실행한 발효의 압력은 0.2-0.27 bar를 유지하였다. 30 및 500 L 발효의 DO는 40% 이상을 유지하였으나, 5,000 L 발효는 20% DO(실측 DO = 0%)로 확인되어 30 및 500 L 발효 보다 낮은 재조합 대장균 성장 및 R-P66 생산 결과를 나타냈다.

3 종의 발효는 5 ~ 7 시간 발효에서 초기 발효 배지의 당을 모두 소모하여 feeding이 진행(500 및 5,000 L 발효는 Feeding 배지에 antifoam 첨가)되었으며, 0.5 mM IPTG induction은 O.D.600nm = 46 ~ 52의 성장 시점에 진행되었다. IPTG induction 후의 최대 성장률은 7 ~ 11 u/h였으며, 배양 종료 시까지 배지 내 당은 0.12 g/L 이하로 유지되었다. 발효 초기 배지 1 L 당 약 180 mL의 Feeding 배지를 사용한 3 종의 상용화 발효 모두에서 5 L 발효와 유사하게

다량의 R-P66 생산이 되었으며, 발효 소요 시간(25 ~ 26 시간) 또한 실험용 5 L 발효와 유사하였다. 5 kL 발효의 wet cell은 (90-100 g/L 배양액)으로 확인되었으며, 30 L 발효의 wet IB는 (73 g/L 배양액)으로 확인되었다. 5 kL 발효의 경우, DO 유지를 위한 산소의 주입 또는 발효법의 개량이 이루어지면, R-P66 생산량은 지금의 결과보다 증가할 것으로 판단된다. 또한, 상용화 발효 시험과 실험용 5 L 발효 시험의 유사한 결과를 근거로, 산소 공급 장비를 500 또는 5,000 L 발효기에 연결하면 R-P66의 상용화 대량생산을 위한 강화된 고밀도 재조합 대장균 배양이 가능할 것이다.

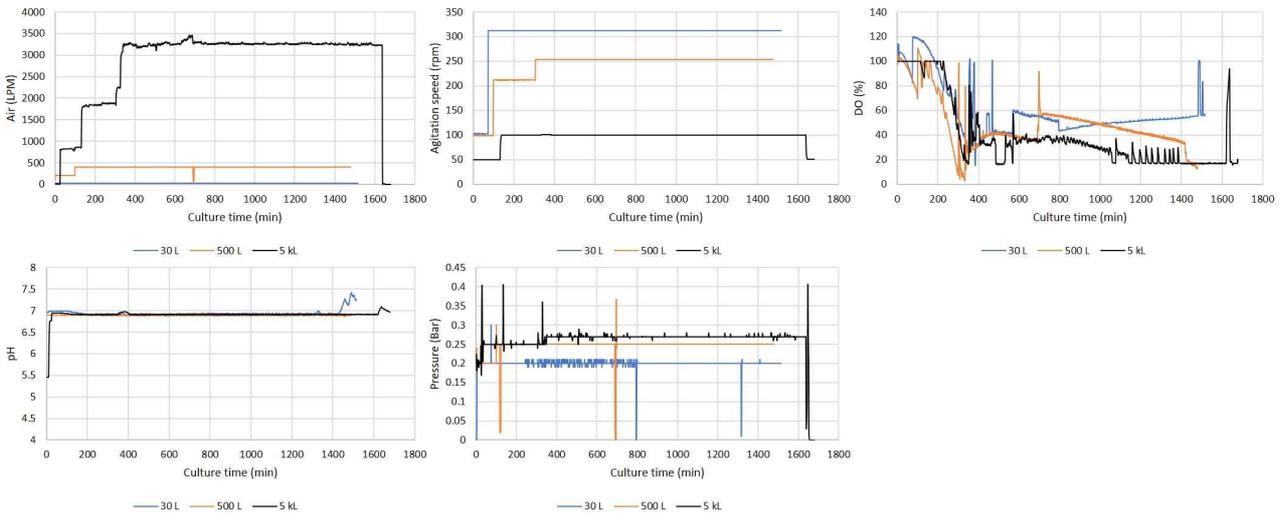


그림 3-3-29. 30, 500 및 5,000 L 발효기 사용 발효에서의 air, agitaion speed, DO, pH 및 압력

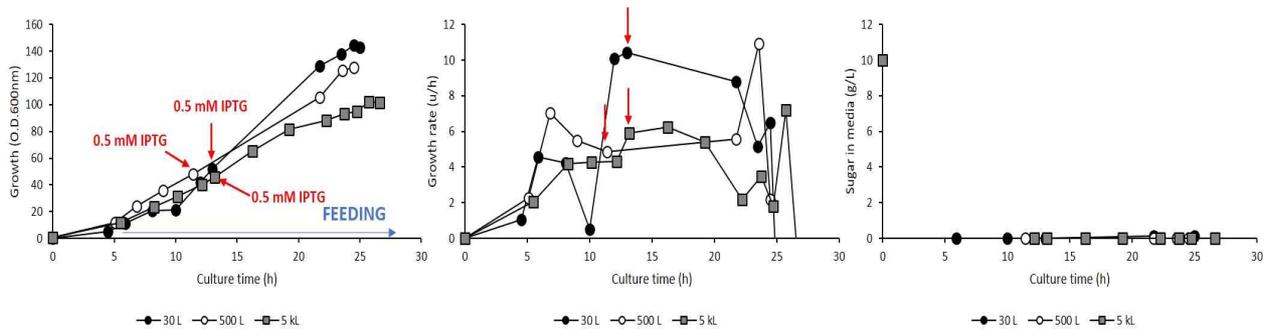


그림 3-3-30. 30, 500 및 5,000 L 발효기에서 재조합 대장균의 성장

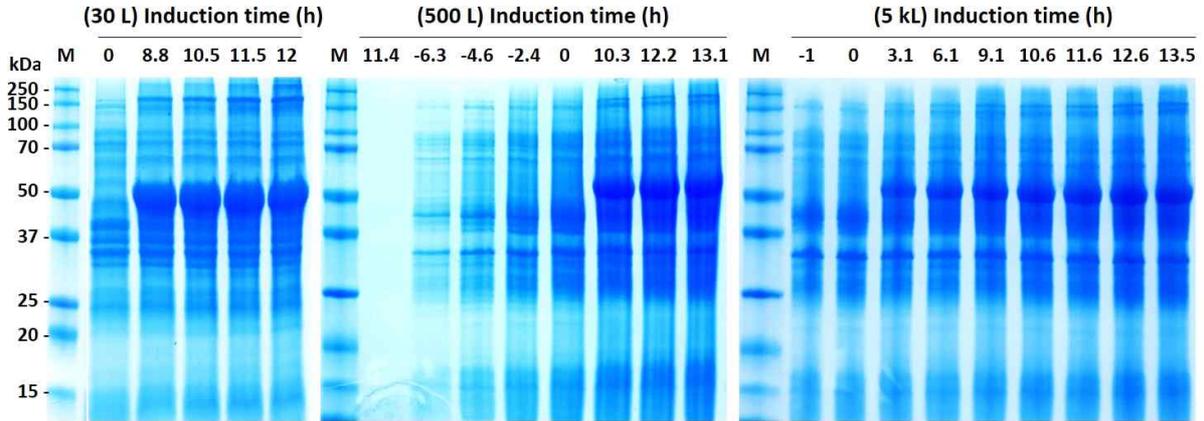


그림 3-3-31. 30, 500 및 5,000 L 발효기에서의 R-P66 I.B. 생산

2. R-P66 I.B. 추출

가. 세포 파쇄 확인

재조합 대장균 발효로 생산되는 R-P66은 불활성의 봉입체(I.B., inclusion body)이며, R-P66 I.B.의 추출을 위해서는 재조합 대장균 세포 파쇄가 필요하다. 최적의 세포 파쇄 조건을 찾기 위해, lysis buffer로 부유한 세포액과 발효액을 일정 압력의 Nano disperer에 1 또는 2회 통과시켰다(Fig 3-3-32 좌). 세포 부유액은 500 bar, 1 pass에서 35%의 세포가 생존했으며, 높은 통과 압력에 따라 세포 생존률이 감소하였다(900 ~ 1,000 bar = 10 ~ 11%). 세포 파쇄에 있어서 고압력은 중요한 인자일 수 있겠지만, 통과 횟수에 따라 세포 파쇄는 더 효과적으로 이루어졌다. 500 bar, 2 회의 고압분산기 통과로 약 94%의 재조합 대장균이 파쇄되었으며, 1,000 bar×2 pass에서 약 98%의 재조합 대장균이 파쇄되었다.

Lysis buffer를 구성하는 Triton X-100의 세포 파쇄 영향을 확인하기 위해, 발효액 또는 0.5% Triton X-100 첨가 발효액을 1,000 bar(14,504 psi)에서 파쇄하였다(Fig 3-3-32 우). 세포 부유액 파쇄와 유사하게 압력 통과 횟수에 따라 세포 파쇄 정도가 증가하여 발효액 또는 0.5% Triton X-100 첨가 발효액은 1 및 2 회 통과로 94 ~ 95% 및 99 ~ 99.9%의 재조합 대장균이 파쇄되었다. 세포 파쇄 측면에서 Triton X-100은 큰 영향을 주지 않지만, R-P66 I.B. 회수에서 두드러진 영향을 주었다. Triton X-100 미첨가 세포 파쇄는 파쇄액 내 층 분리가 발생하지 않았고, Triton X-100을 첨가한 세포 파쇄만으로도 R-P66 I.B. 층이 침전되었는데, 이러한 층 분리는 원심분리 I.B. 회수를 용이하게 해준다. Triton X-100을 첨가한 세포 파쇄액을 원심분리 하면, 아이보리색의 R-P66 I.B.가 침전되고, cell debris는 상층액에 존재하는 R-P66 I.B. 정제가 가능하였다.

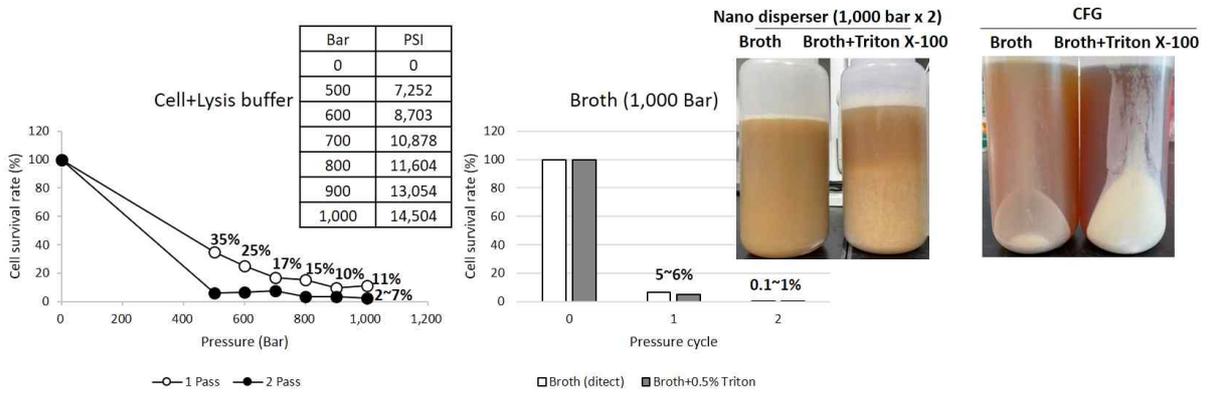


그림 3-3-32. Nano disperser를 이용한 재조합 대장균 파쇄 및 R-P66 I.B. 회수

나. 세포 파쇄 회수 결정

발효액에 20 mM boric acid(pH 8.0)과 0.5% Triton X-100을 첨가한 세포 파쇄에서 파쇄 회수는 파쇄 결과물의 변화를 발생시켰다(Fig. 3-3-33). 정성적 측면에서, 1 회 파쇄로 높아진 파쇄액 점성(파쇄에 의한 핵산 용출 등)은 2 회 이상부터 사라졌으며, 2 회 이상의 파쇄부터 거품 및 발열이 증가하였다. 2 회의 세포 파쇄로 발생하는 R-P66 I.B. 층은 3 회 이상의 세포 파쇄로 발효액과 재균질화가 일어났으며, 3 회 이상의 파쇄부터 회수 I.B.의 무게가 감소하였다. 구체적으로, 300 mL의 발효액을 1 ~ 2 회 및 3 ~ 5 회 파쇄 후 washing으로 회수한 R-P66 I.B.의 무게는 각 $28.6 \pm 1.0(100\%)$ 및 $17.6 \pm 2.5(61.6\%)$ g이었다. 이러한 차이는 3 회 이상 파쇄로부터 발생하는 재균질화에 의한 것으로 판단되는데, 재균질화된 파쇄액은 2 회의 Triton X-100 washing 과정에서 단단하지 않은 침전(R-P66 분획)을 형성하여 회수 손실을 발생시켰다. SDS-PAGE에서 확인한 R-P66 I.B. 회수율 또한 2 회 세포 파쇄가 최적의 파쇄 회수인 것을 보여줬다.

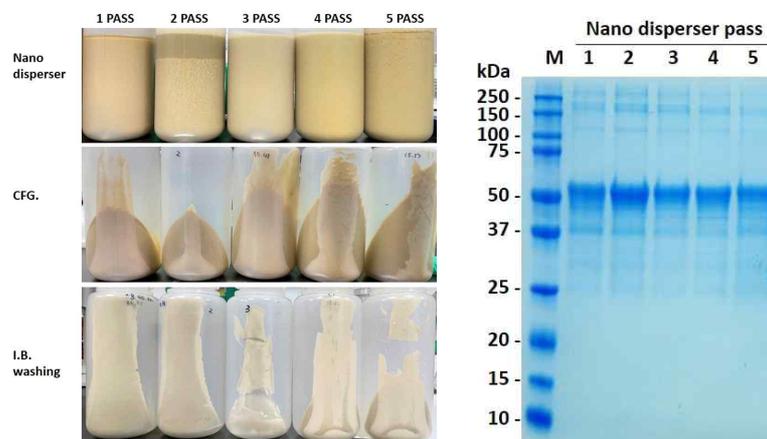


그림 3-3-33. 세포 파쇄 회수에 따른 물성 변화 및 회수 R-P66 I.B.

다. I.B. 회수 최적화

(1) 세포 파쇄 chamber 타입

균질화기 Nano disperser 또는 Microfluidizer는 Z- 또는 Y-type chamber가 장착되어 있으며, 두 chamber는 사용 영역에서 차이가 있다. 일반적으로, Z-chamber는 세포 파쇄, particle size reduction 및 deagglomeration 등에 사용되며, Y-chamber는 nanoemulsion, lipid nanoparticle, encapsulation 및 polymer particle에 사용된다. 0.5% Triton X-100이 첨가된 발효액을 Z- 및 Y-type chamber로 파쇄하여 얻은 1 g R-P66 I.B. 내 단백질은 114.6 ± 0.5 및 112.9 ± 0.2 mg으로 서로 간 큰 차이가 없었다. 2 회 세포 파쇄로 고정한 실험에서 chamber type과 파쇄 압력은 R-P66 I.B. 추출에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(Fig. 3-3-34).

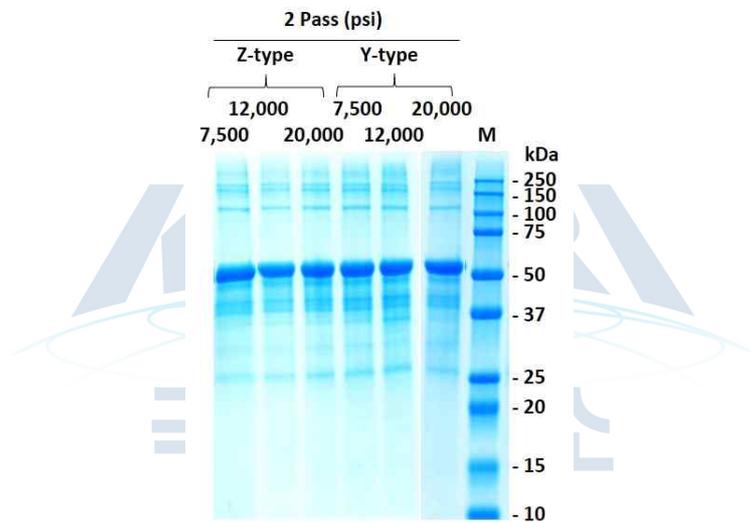


그림 3-3-34. Chamber type과 파쇄 압력에 따른 R-P66 I.B. 추출

(2) I.B. 회수

R-P66 I.B. 회수에 있어서 chamber type과 사용 압력보다는 Triton X-100 첨가 및 2 회의 파쇄 횟수가 중요한 것을 확인하였다. 2 회의 세포 파쇄에서 효율적인 R-P66 I.B. 회수 방법을 결정하기 위해, 세포 부유액과 발효액에 대한 세포 파쇄를 수행하고 R-P66 I.B. washing의 필요성을 점검하였다(그림 3-3-35). 흥미롭게도, 세포 부유액에서 시작한 R-P66 I.B. 회수는 Triton X-100 washing과 buffer washing이 필수였으며, 발효액에서 시작한 R-P66 I.B. 회수에서는 washing과 무관하게 R-P66 I.B.이 회수되었다. 비록, washing은 상대적으로 밀도 높은 R-P66 I.B. 회수를 가능하게 하지만, 효율적 공정을 고려한다면 발효액의 파쇄 및 no washing으로 R-P66 I.B.를 회수해야 하는 것으로 판단된다. 회수율 및 R-P66 생산성 측면에서 발효액

파쇄 후 washing 없는 사용은 washing 과정에서 발생하는 다량 R-P66 I.B. 손실을 방지하는 것으로 확인되었고, 회수 R-P66 I.B.의 무게는 washing과 no washing에서 최대 약 11 배의 차이를 보였다. Washing과 no washing 후의 회수 R-P66 I.B.를 refolding하면 총 활성에서 약 7.5 배의 차이가 발생하였다. 참고로, 최적의 R-P66 I.B. 회수 방법은 0.5% Triton X-100이 첨가된 발효액의 2 회의 세포 파쇄 및 washing 없는 회수인 것으로 확인하였다.

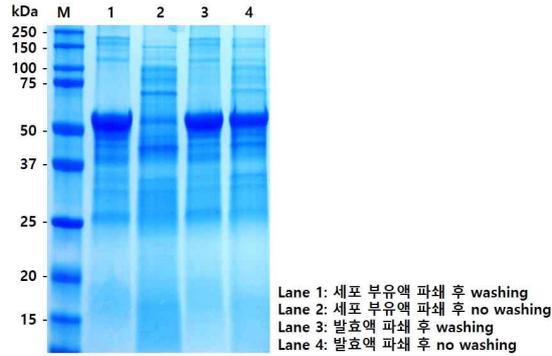


그림 3-3-35. R-P66 I.B. 회수에서의 washing 영향

라. 산업용 발효의 발효액으로부터 I.B. 회수

30, 500 및 5,000 L 발효기에서 수행한 재조합 대장균의 산업용 발효 중, 5,000 L 발효기의 발효액 내 세포(90-100 g/L 발효액)는 tubular 원심분리로 일부 회수하여 냉동 보관하였다. 30 및 500 L 발효기 발효액은 0.5% Triton X-100 첨가 후 High Pressure Homogenizer에 의해 파쇄되었다. 실험실에서 수행한 Nano disperser 세포 파쇄와 마찬가지로 세포 파쇄에 의한 R-P66 I.B. 층이 확인되었으며, 원심분리를 통해 R-P66 I.B.를 회수하였다(그림 3-3-36). 2 회 파쇄 및 tubular 또는 disk 원심분리로 회수한 R-P66 I.B.는 일부 손실(원심분리 Sup.)이 있었고, 손실을 제외한 R-P66 I.B.(73 g/L 배양액)는 실험실에서 냉동 보관하였다. 산업용 발효기로 생산한 R-P66 I.B.은 R-P66 대량 생산법 구축에 사용되었다.

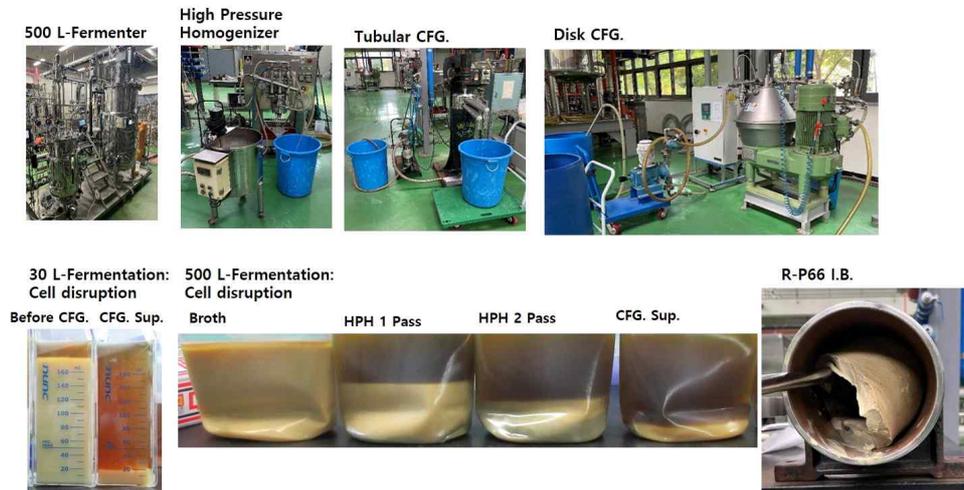


그림 3-3-36. 산업 발효로부터 R-P66 I.B. 회수

3. 활성형 R-P66 생산

가. Unfolding

(1) Urea 농도 및 unfolding 용액 내 I.B. 함량

R-P66 I.B.를 가용화하는 최적의 urea 농도 확인을 위해, 10 mM mercaptoethanol이 포함된 0 ~ 6 M urea에서 5% R-P66 I.B.을 반응하였다. 2 M의 urea부터 unfolded R-P66 I.B.가 상층액으로 가용화되었으며(56%, 100% = 4 M urea), 3 M urea 이상에서 최대 R-P66 I.B. 가용화를 확인하였다. 3 M urea에서 91%의 R-P66 I.B.이 용출되었으며, 3 ~ 6 M urea에 의한 용출 단백질은 6.15 ± 0.29 ug/uL(1 g R-P66 I.B.의 최대 용출 단백질 = 123 mg)이었다. R-P66 I.B.를 가용화하는 최적의 urea는 3 M 이상으로 확인되었다.

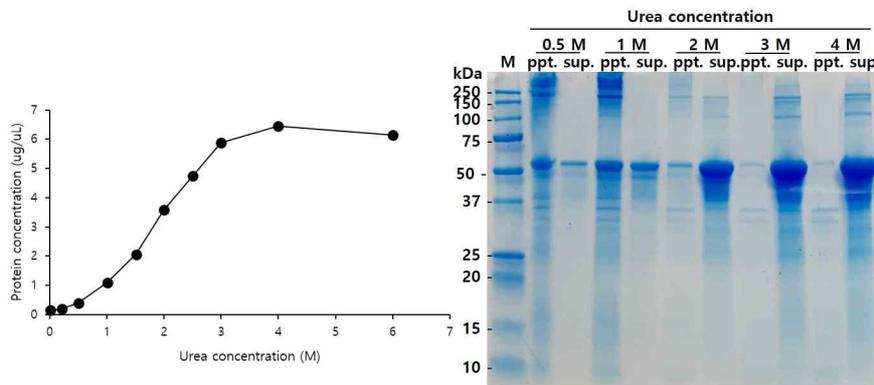


그림 3-3-37. Urea 농도에 따른 R-P66 I.B.의 가용화

(2) Unfolding 불용성 분획

6 M의 urea가 포함된 unfolding 용액을 이용한 5% R-P66 I.B. 가용화에서도 원심분리 후 침전물 잔존이 확인되었다. 이 불용성 분획의 추가 가용화 가능 여부를 확인하기 위해, R-P66 I.B.의 첨가 농도를 최대 2 배 희석(2.5%)하여 4 M urea의 unfolding 용액에서 가용화하였다 (그림 3-3-38). 1 ~ 2 배 R-P66 I.B. 희석 가용화에서도 수용 단백질의 양은 큰 변화가 없었으며, 가용화 후 잔존 침전물은 존재하였다.

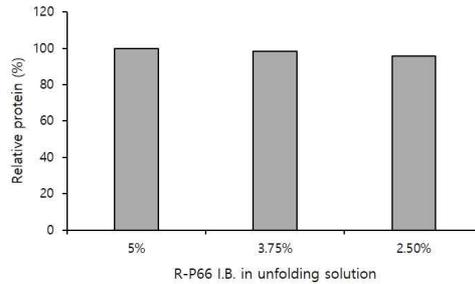


그림 3-3-38. R-P66 I.B. 농도를 달리한 가용액 내 단백질

잔존 불용성 분획을 회수하기 위해, 3 ~ 5 M urea±10 mM mercaptoethanol(2-ME)이 포함된 unfolding 용액으로 2.5 ~ 5% R-P66 I.B.를 가용화한 후, 침전 불용성 분획을 세척하였다 (그림 3-3-39). 세척된 침전물은 cell debris와 unknown ppt.로 구분되는데, 2-ME가 첨가된 상태에서 고농도의 urea를 사용할수록 cell debris는 가용화되는 것을 확인하였다. 2-ME를 첨가하지 않은 3 ~ 4 M urea에서 확인된 cell debris+unknown ppt.는 R-P66 I.B.의 최소 53-54%(w/w)를 차지하였다. 5 M urea+10 mM 2-ME 이용 unfolding의 불용성 분획에서 대부분의 cell debris가 가용화되어 unknown ppt.는 R-P66 I.B.의 약 14%(w/w)에 해당하는 것을 확인하였다. 결국, wet R-P66 I.B.는 수분을 포함한 상태에서 약 40% cell debris, 약 14 ~ 15% unknown ppt. 및 약 45 ~ 46% R-P66으로 구성된 것으로 예측된다. Wet R-P66 I.B.를 동결건조하면, 약 72%의 수분이 제거된 R-P66 I.B. powder를 얻을 수 있었다. 이를 종합하면, 최종 1 g wet R-P66 I.B. 내 순수한 R-P66은 약 126 ~ 129 mg으로 계산된다. 이는 3 ~ 6 M urea에 의한 용출 최대 단백질이 1 g wet R-P66 I.B. 당 123 mg인 것(그림 3-3-37)과 유사한 결과를 보였다. Cell debris를 제거한 unknown ppt.의 단백질은 가용화 R-P66 I.B. 단백질의 1.5 ~ 3.3%의 단백질이었으며, SDS-PAGE에서 확인한 unknown ppt. 단백질은 약 35 ~ 50 kDa의 크기의 단백질이었다(R-P66 = 50 kDa 이상). 결론적으로, 3 ~ 6 M의 urea 사용만으로도 정제된 unfolded R-P66을 얻을 수 있는 것을 확인하였다.

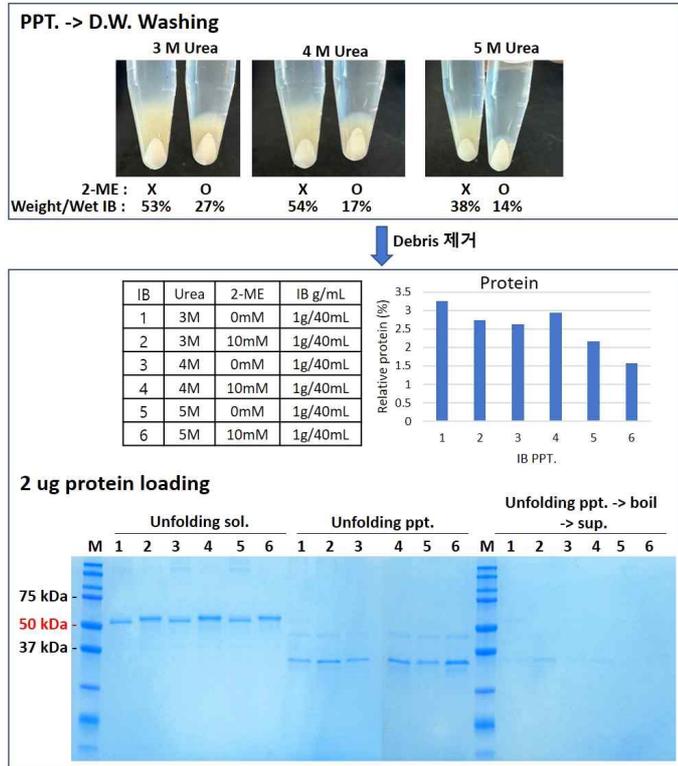
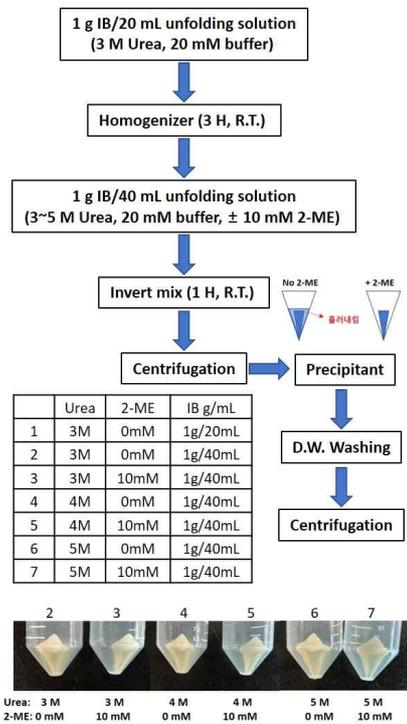


그림 3-3-39. R-P66 I.B.의 cell debris 및 unknown 단백질 분석

(2) Buffer 선별

기존에 사용하던 unfolding 및 refolding buffer(glycine 또는 boric acid)를 대체할 수 있는 buffer 탐색을 위해, Tris-HCl, boric acid, glycine 또는 NaHCO₃를 buffer로 사용하여 균질화한 R-P66 I.B.의 unfolding을 진행하였다(그림 3-3-40). Unfolding 후 침전은 모든 buffer에서 존재하였으며, unfolded R-P66의 양은 boric acid(100%; 8.84 ug/uL)와 NaHCO₃(95%; 8.43 ug/uL) buffer에서 높았으며, Tris-HCl 및 glycine buffer에서는 unfolded R-P66 용출 효율(86%)이 낮았다. 비록 boric acid에서의 단백질 용출이 가장 높지만, boric acid의 독성(예, 산모 유산)을 고려하여 NaHCO₃ 사용이 unfolding 및 refolding에 적합한 것으로 결정하였다. 실험에 사용한 NaHCO₃는 식품첨가물로 사용되는 중성의 NaHCO₃ 또는 약한 base로 1 종 세척제(야채, 과일 및 식기세척제), 치약 및 발효제로 사용되고 있다.

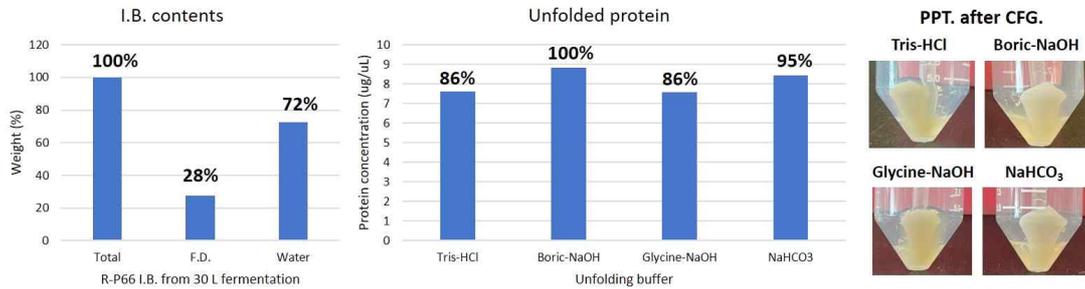


그림 3-3-40. R-P66 생산을 위한 buffer 선별

(4) Unfolding 용액의 urea 제거

기존의 unfolding 및 refolding 방법은 다음과 같다: ① 1 g R-P66 I.B.에 unfolding 용액 첨가, ② 원심분리로 획득한 unfolding 상층액을 refolding 용액과 혼합, ③ 저온 배양. 기존의 refolding 방법의 최종 urea 농도는 0.15 ~ 0.6 M이며, 1 M이 초과하는 urea 농도에서는 urea의 단백질 변성 역할에 의해 refolding이 진행되지 않는다. Refolding이 진행되지 않으면, unfolded 단백질의 양의 변화가 없으며, 활성형 R-P66으로의 전환 또한 진행되지 않는다.

Refolding 진행 전 과정으로 urea를 1 M 이하로 낮출 수 있으면, 과도한 refolding 용액을 사용하여 발생하는 후속 과정의 문제(예, 농축)를 해결할 수 있다. 이를 확인하기 위해, 4 M urea로 가용화한 unfolded R-P66을 0.4 ~ 3 M urea가 되도록 투석하였다(그림 3-3-41). 투석된 unfolded R-P66은 4 M urea의 unfolded R-P66 대비 99.6±4.8%의 단백질을 함유하였으며, 3 ~ 4 및 0.4 ~ 1 M urea의 unfolded R-P66은 1:20 희석 refolding 과정을 거쳐 23.6±0.1% 및 14.6±1.1%는 활성 R-P66로 전환되었다. 3 ~ 4 M urea의 unfolded R-P66 보다 0.4 ~ 1 M urea에서 낮은 효소 회수율이 발생하는 것은 희석에서 너무 낮은 urea 농도(0.02 ~ 0.05 M)를 사용한 결과로 판단된다. Urea의 농도가 높거나(4 M urea unfolding의 1:4; 0.8 M urea; 11.4% 회수율) 낮으면(0.4 ~ 1 M urea unfolding의 1:20), urea의 단백질 변성 특성과 단백질분해효소의 auto lysis 특성이 복합적으로 작용할 수 있으므로 적절한 urea 농도(0.14 ~ 0.6 M; 20% 이상 회수율)에서의 refolding 조건 확립이 R-P66 회수에 중요하다. R-P66의 회수율이 가장 좋은 refolding 조건은 4 M 또는 3 M urea의 unfolded R-P66을 1:10 ~ 20 희석하는 것으로 확인되었다. 하지만, 4 M urea로부터 0.4 M urea 까지 단백질 변성제의 농도를 낮춘 unfolded R-P66을 적절한 urea 농도에서 refolding 한다면 R-P66의 농축 문제를 해결하면서 동시에 높은 회수율로 효소 생산이 가능하여 1:20 희석 같은 기존의 방법보다 유리한 R-P66 생산 방안이 될 것이다.

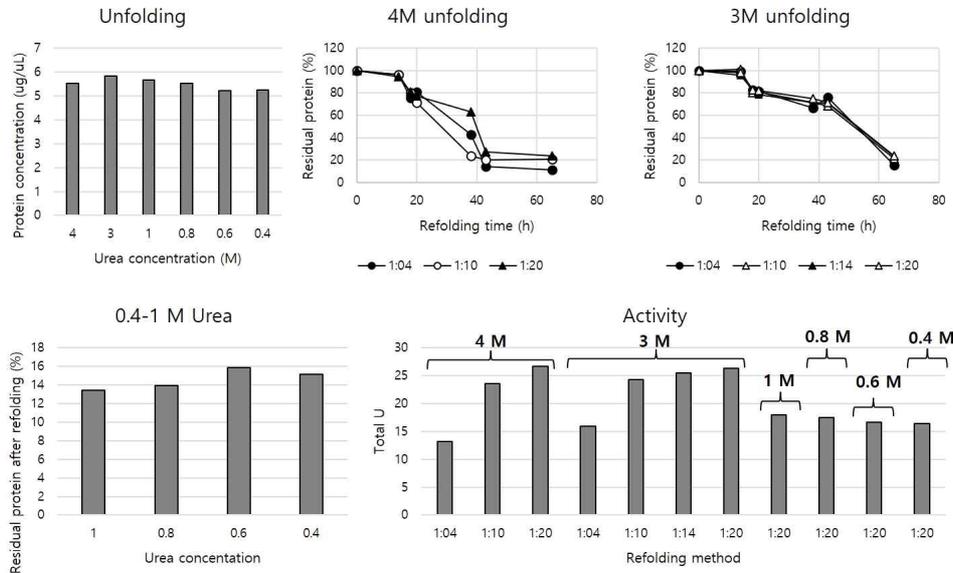


그림 3-3-41. Unfolded R-P66의 urea 제거 및 refolding

0.4 M urea로 전환된 unfolded R-P66은 12 일 동안 4°C 보관으로 약 40% 단백질이 손실 되지만, 이를 4 배 농축하여 4°C (91%) 또는 -80°C (94%)에서 보관하거나, 3 M 이상의 urea 상태로 보관(101%) 및 즉시 0.4 M urea로 전환 사용해야 단백질 손실이 없는 것을 확인하였다.

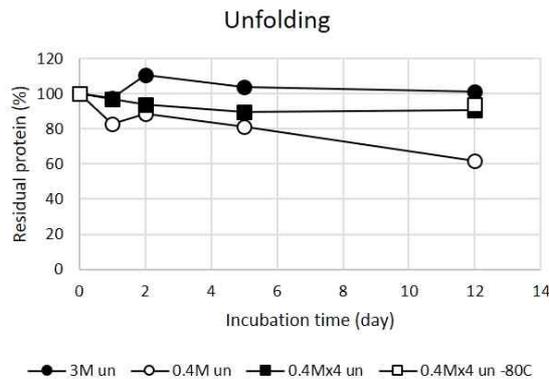


그림 3-3-42. Unfolded R-P66 보관 가능 방법 확인

1 g R-P66 I.B. 내 120 ~ 130 mg의 R-P66 대부분은 unfolding 용액으로 가용화할 수 있다. Unfolding 후 잔존 cell debris 및 unknown ppt.는 원심분리로 제거할 수 있으며, 원심분리로 획득한 unfolded R-P66은 높은 정제도를 보였다. Unfolded R-P66 내 urea는 0.4 M로 전환이 가능하며, 이러한 urea 농도 전환은 농축 효소 refolding을 가능하게 해주기 때문에, 지속적인 연구 수행이 필요하다.

나. Refolding

(1) 산업용 발효 I.B. refolding

산업용 발효로 회수한 R-P66 I.B.의 quality를 확인하기 위해, 유가식 발효 ②(O.D.600nm = 128 induction, 최대 O.D.600nm = 242)의 R-P66 I.B.와 비교하는 refolding을 진행하였다. 세포 파쇄 후 washing 과정을 거치지 않은 unfolding 용액 내 5%(w/v)의 산업용 발효 R-P66 I.B.는 refolding으로 0.68 U/mL의 R-P66(62.5 mg/L)으로 전환되었으며, 세포 파쇄 후 1% Triton X-100 washing 및 buffer washing을 유가식 발효 ② R-P66 I.B.는 0.62 U/mL의 52 mg/L 효소로 전환되었다. 세포 파쇄 후의 R-P66 I.B.의 washing은 R-P66 I.B. 정제도 향상 및 R-P66 I.B. 회수 손실의 장·단점이 있다. R-P66 I.B. unfolding 용액의 원심분리를 통해 cell debris 및 기타 impurity는 쉽게 제거되어 전체적으로 I.B. washing 없는 R-P66 I.B.를 사용한 refolding이 생산 수율에 유리하였다. 특이하게도, Disk 타입의 원심분리로 회수한 R-P66 I.B.는 unfolding 용액 내에서 단백질 함량이 낮았는데, 이는 세포 파쇄물의 장시간 4°C 보관에 의한 것으로 추론된다(그림 3-3-43). 이후의 실험은 주로 30 L 발효기의 R-P66 I.B.(표준 I.B.)를 사용하여 진행하였다.

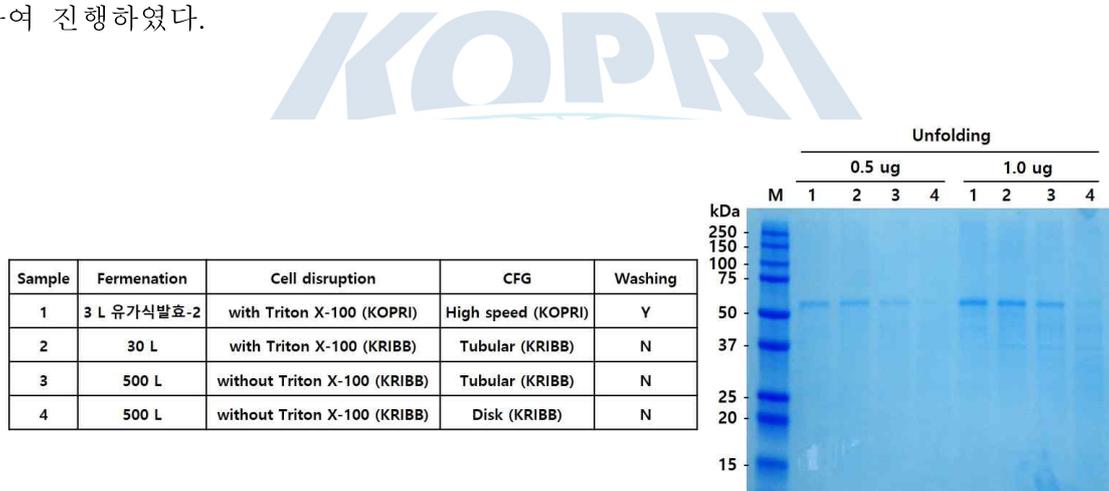


그림 3-3-43. 산업 발효 R-P66 I.B. unfolding

(2) Refolding 용액 구성물 농도 결정

기존의 unfolding 및 refolding 구성 물질에 포함되는 cysteine과 cystine은 R-P66의 disulfide bond가 refolding 시 적절한 위치에서 구성되도록 첨가되었으나, 두 물질 같은 oxidizing 및 reducing agent는 R-P66의 refolding에 특별한 기능을 하지 않았다. Oxidizing 및 reducing agent를 제외한 refolding 용액 일부 구성물의 농도 변화를 통해, NaCl의 첨가는 refolding 수율 증가에 영향을 주며, 500 mM 이상의 CaCl₂은 refolding 수율을 감소시키는 것이 확인되었다. 또한, 0.5% 이상의 Tween 20은 refolding을 억제하며, pH를 위한 buffer 성분

의 농도는 refolding에 영향을 주지 않았다. 4 가지 인자의 이러한 영향은 다음과 같은 효과에 기인한 것으로 판단된다: ① NaCl: 이온을 R-P66에게 제공하여 auto-lysis를 억제함, ② CaCl₂: R-P66의 folding에 직접적으로 관여하고 효소 활성화의 중요 인자이지만 과도한 calcium은 auto-lysis를 가속화하여 refolding 수율을 감소시킴, ③ Tween 20: 단백질 분산의 효과로 auto-lysis 발생을 최소화할 수 있으나 과도한 첨가는 R-P66 folding을 저해. 결론적으로, refolding 용액의 buffer, NaCl, Tween 20 및 CaCl₂는 R-P66 refolding에서 수율과 활성에 영향을 주는 인자이며, Tween 20 및 CaCl₂는 첨가 농도를 결정할 필요가 있다.

	NaCl	Glycine	Tween 20	CaCl ₂
1	1M	20mM	0.05%	20mM
2	0M	20mM	0.05%	20mM
3	0M	20mM	0.05%	100mM
4	0M	20mM	0.05%	200mM
5	0M	20mM	0.05%	500mM
6	0M	20mM	0.05%	1000mM
7	0M	200mM	0.05%	20mM
8	0M	20mM	0.5%	20mM
9	0M	200mM	0.5%	20mM
10	0M	200mM	0.5%	500mM
11	0M	200mM	0.5%	1000mM

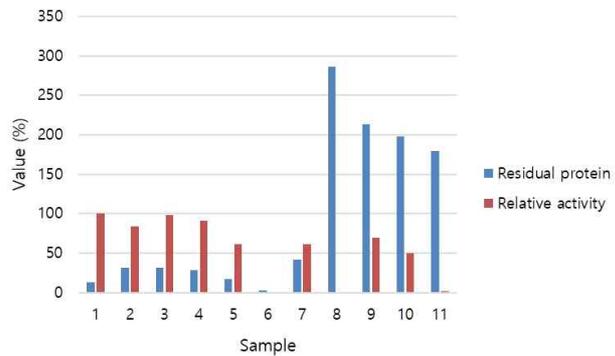


그림 3-3-44. R-P66 refolding 용액 내 첨가물들의 refolding 영향

(3) Refolding buffer 선택

R-P66 생산을 위한 최적의 buffer를 선별하였다. Unfolding 및 refolding을 Tris-HCl, glycine, boric acid 또는 NaHCO₃에서 진행하였을 때 refolding 잔존 단백질은 33, 38, 35 및 31%로 측정되었으며, mg 당 활성은 이전 연구로 생산 및 보관 중이던 R-P66(100%, 13.5 U/mg) 비교하여, Tris-HCl, glycine, boric acid 또는 NaHCO₃ 사용 refolding에서 106, 78, 98 및 101%로 확인되었다. Glycine은 아미노산으로서 단백질분해효소 안정화제로도 사용되는 만큼 효소의 refolding을 부분적으로 방해하거나 효소의 활성을 억제하는 것으로 판단된다. 총 활성을 고려하면(100%=Tris-HCl), boric acid 사용이 R-P66 생산에 가장 유리하지만, boric acid(181%) 같은 독성이 없는 NaHCO₃를 사용(128%)하는 것이 가장 적합한 것을 확인하였다.

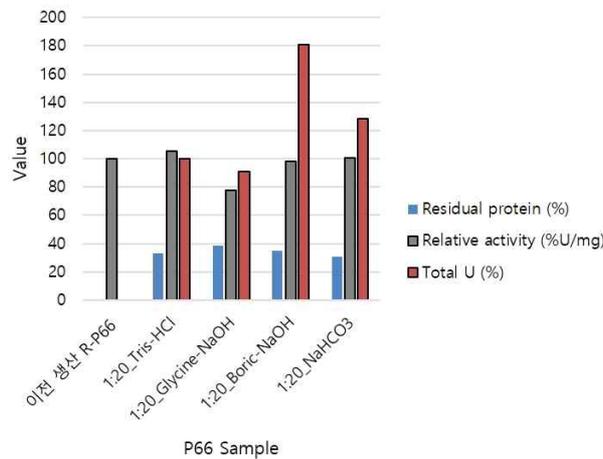


그림 3-3-45. Refolding 사용 buffer 선별

NaHCO₃ 사용 unfolding 및 refolding 외에도 다양한 refolding buffer를 테스트하였다. NaHCO₃ 사용 unfolded R-P66을 20 mM의 각 buffer 첨가 refolding 용액에서 활성 전환을 유도하였다. 각 buffer에서의 refolding 결과는 다음과 같다: sodium phosphate, sodium hydrogen carbonate 및 sodium sulfate는 refolding 용액의 Ca²⁺과의 반응으로 침전이 발생; trisodium citrate, ammonium citrate 및 ammonium calcium citrate buffer에서는 refolding이 진행되지 않음(residual protein = 109.8±3.6%). 5% ammonium calcium citrate(22.25 mM ammonium citrate+2.2 mM Ca₃ citrate)를 각 테스트 buffer와 함께 사용한 refolding에서, sodium formate, sodium acetate, sodium hydrogen carbonate 및 sodium sulfate buffer 사용은 refolding이 진행되었으며, NaHCO₃ 사용 refolding의 회수 단백질 대비 103.3±11.3%의 회수 단백질을 기록하여 refolding에 사용할 수 있는 buffer로 분류하였다. 다만, sodium hydrogen carbonate와 sodium sulfate buffer는 CaCl₂에 의한 침전 발생이 유도되는 점을 해결할 필요가 있다. Ammonium calcium citrate를 APG 0810과 APG 1214 비이온성 계면활성제와 함께 사용하면, Genencor사의 subtilisin인 Purafect의 안정이 향상되는 특허가 있다¹⁶⁾. Purafect 액상 효소에는 alkanolamineborate(monoethanolamine borate, diethanolamine borate 그리고/또는 triethanolamine borate)이 보존제로서 이미 첨가되어 있는 점을 고려하면, ammonium calcium citrate, APG 0810 및 APG 1214 조합만으로는 높은 효소 안정화제를 구성할 수 없을 것으로 판단된다. 하지만, ammonium calcium citrate에서 R-P66의 refolding이 가능하기 때문에, 이 buffer 성분은 refolding과 보존제 조성으로 활용 가치가 있을 것으로 예상된다.

16) Composite stabilizer for stabilizing protease in laundry detergent(CN109762671B), 夏咏梅, 李磊, 吴美娜, 何文广, 方云, 胡学一

(4) 보존제 후보 물질들의 auto-lysis 방지 영향

기존의 연구에서 확립한 R-P66의 열 안정제 후보 물질은 glycerol, propylene glycol, 4-fotmyl phenyl boronic acid, betaine, sucrose 등이 있다. Refolding 완료 후 24시간 동안 4°C 에서 방치한 refolded R-P66에서 최종 0-24%의 sucrose는 효소 auto-lysis 방지 효과가 없었지만, 25% glycerol+25% propylene glycol(50% GPG)은 auto-lysis를 방지하였다(그림 3-4-46). Refolding 된 R-P66은 24시간, 4°C 보관으로 85.5±7.8% 단백질 및 89.8±3.8% 총 활성이 잔존하는 auto-lysis가 발생하지만, 50% GPG 첨가로 R-P66은 114.2±13.7% 단백질 및 104.4±5.0%의 총 활성을 유지하였다.

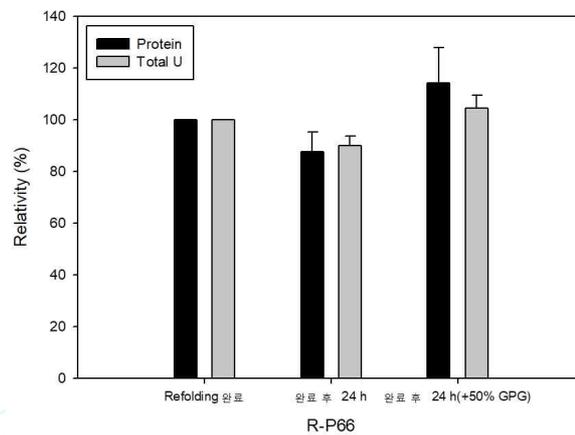


그림 3-4-46. 보존제 후보 물질에 의한 R-P66의 auto-lysis 방지 효과

R-P66의 저온 auto-lysis를 방지할 수 있는 50% GPG를 효소 refolding 용액에 첨가하면, unfolded 단백질의 양적 감소와 활성형 효소로의 전환이 특징인 refolding이 진행되지 않았다. 1% glycerol과 5% propylene glycol을 refolding 용액에 첨가 사용하면 refolding은 진행되지만, auto-lysis 억제 효과를 뚜렷하게 규명할 수 없었다. 결론적으로, 열 안정성과 auto-lysis 방지 효과가 있는 50% GPG는 refolding 반응을 억제하는 것으로 판단되는데, 이는 unfolded R-P66의 folding을 위해서는 주변에 적절한 물을 요구하기 때문으로 예측된다. 1% glycerol+5% propylene glycol과 50% GPG 사이의 적절한 농도의 보존제를 refolding 시 첨가하면, refolding에서의 auto-lysis를 억제하며 동시에 활성 R-P66을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

(5) Refolding ①

기존의 refolding 방법인 1:20 희석법은 R-P66의 auto-lysis를 억제하는 높은 효율의 refolding 방법이지만, 이에 따라 생산된 R-P66은 농축 및 보존제 첨가의 후속 과정이 필요로

한다. 이를 고려하면 R-P66의 부피를 최소화하며 활성 전환해야 하며, 부피를 최소화하기 위해서는 urea를 제거해야만 한다. 3 M urea의 unfolded R-P66에서의 urea 제거는 buffer를 이용하여 진행되었으며 spin type의 30 kDa cut-off membrane을 거친 0.4 ~ 1.5 M urea의 unfolded R-P66은 약 88.6±2.6%의 단백질 회수율을 보였다(그림 3-3-47 좌상). 회수된 0.4 ~ 1.5 M urea의 unfolded R-P66을 1:20 refolding하면, urea 제거 정도에 따라 단백질 수율과 효소활성이 낮은 것으로 확인되었다(그림 3-3-47 우상). 0.4 ~ 1.5 M urea에서의 1:20 및 1:1의 refolding 효율은 22.1±1.8 및 17.7±0.7%였으며, 3 M urea에서의 1:20 refolding 결과를 기준(100%)으로 0.4 ~ 1.5 M urea에서의 1:20 및 1:1(=1:01)의 총 활성은 90.3±2.6 및 68.6±0.7%였다. 다양한 urea 농도의 unfolded R-P66에 대한 1:1 refolding은 refolding 효율과 활성에서 두드러진 손실을 보였으며, 이는 Fig. 3-3-47 우하의 1:1Ca(x1)과 1:1Ca(x2) 같은 100(74.0±0.6% 총 활성) 및 200 mM CaCl₂ 추가 첨가(75.8±1.4% 총 활성)로 부분적으로 회복되었다. 하지만, unfolded R-P66의 urea 제거 및 적은 refolding 용액을 사용한 효소 활성화를 현실화하기 위해서는, 1:1 refolding과 0.4 ~ 1.5 M urea에서의 1:20 refolding 사이에 유사한 수율을 보유해야 한다.

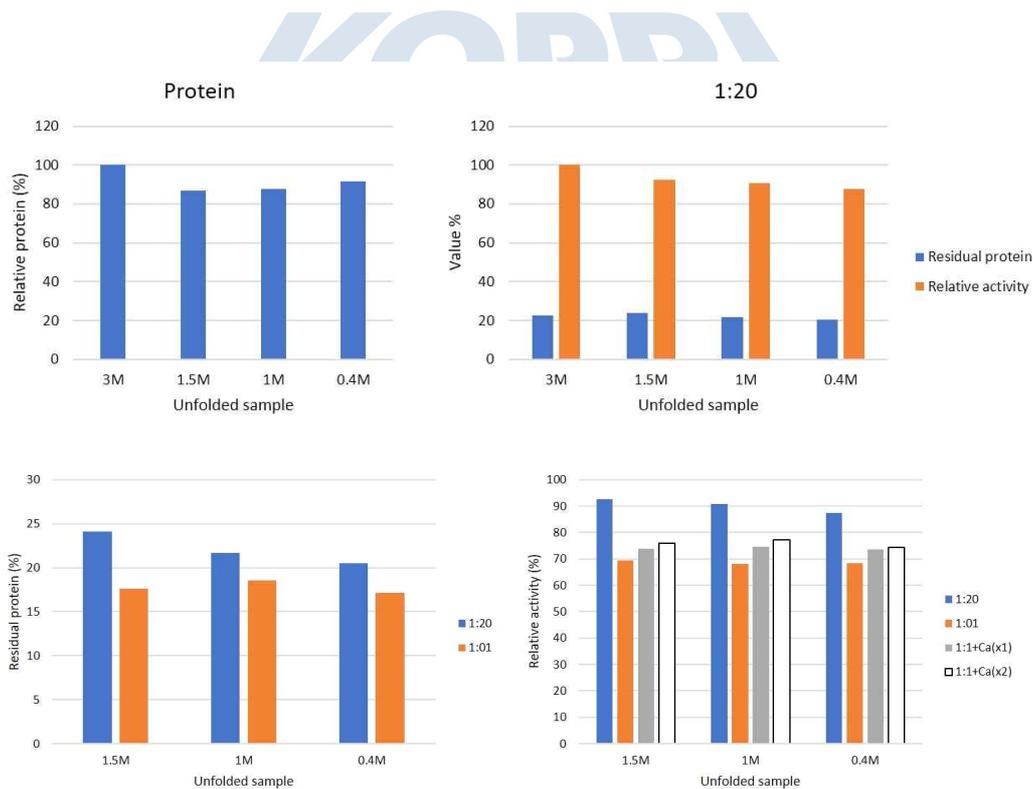


그림 3-3-47. 낮은 urea 농도에서의 refolding

Glycine, NaCl, Tween 20 및 CaCl₂를 추가 첨가한 refolding 용액을 사용한 urea 제거 후 각 농도 urea에서의 1:20 refolding과 1:1 refolding은 서로 유사한 총 활성을 보였다(그림

3-3-48). 비록 3 M urea에서 1:20 refolding을 진행한 standard(7.8 unit, 100% 총 활성)에 비해 urea를 제거한 모든 refolding은 67 ~ 85%의 총 활성의 효소가 생산되었지만, 1 및 0.4 M urea에서의 1:20과 1:1 refolding의 평균 상대활성은 68.9 ± 2.0 및 $82.2 \pm 3.5\%$ 으로 refolding 희석 농도에 따라 효소 회수율 차이가 발생하는 문제는 발견되지 않았다. 흥미롭게도, 1 및 0.4 M urea로의 urea 제거 과정에서 사용한 CaCl_2 는 20 및 65 mM이었으며, 이에 따른 효소 활성의 차이를 확인할 수 있었다.

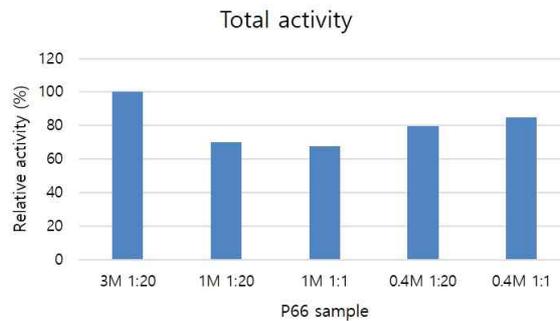


그림 3-3-48. Urea 희석 용액 조절 후 각 urea 농도의 unfolded R-P66의 refolding 활성

3 M urea의 unfolded R-P66에 대한 1:20 희석 refolding과 유사한 효소 활성을 보유한 저농도 urea 및 농축 refolding 생산은 CaCl_2 첨가량 변화로 가능하였다. 앞선 실험과 같은 spin type cut-off membrane을 이용한 urea 제거로 획득한 0.4 M urea의 unfolded R-P66를 최종 75 및 50 mM CaCl_2 이 첨가된 1:1 및 1:0 refolding에 사용하였다(그림 3-3-49). Refolding 과정에 첨가한 sucrose stabilizer는 농도 의존적으로 refolding을 억제하였으며, 0.4 M urea의 unfolded R-P66은 1:1 및 1:0의 refolding으로 3 M urea의 1:20 refolding 활성의 약 96 ~ 98% 및 90%의 활성을 보유하였다.

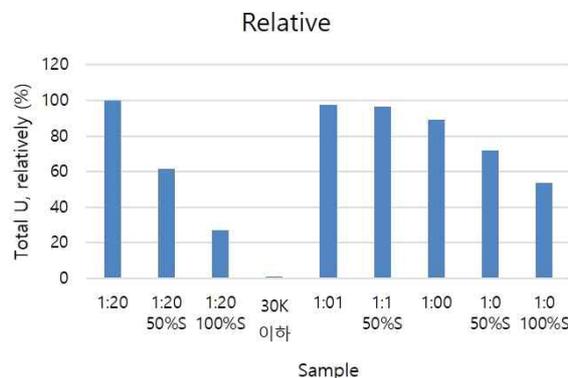


그림 3-3-49. 0.4 M urea의 unfolded R-P66의 고농도 refolding

앞선 결과와 같은 원심분리용 cut-off membrane 사용 그리고/또는 urea 제거 용액 내 CaCl₂ 첨가는 urea 제거 과정에서 균일한 결과 획득을 방해했다. 원심분리용 membrane은 종종 한정된 구역 내 높은 압력을 유도하여 unfolded R-P66의 aggregation을 발생시켰으며, 낮은 urea 농도에서 CaCl₂은 고농도의 unfolded R-P66의 refolding을 유도하여 filter의 비정상적 작동을 발생시켰다. 고품 응집된 unfolded R-P66은 가용화가 어려워 unfolded R-P66 회수에 문제를 일으켰다. 이러한 실험상의 비균질성으로 인해, 3 M urea의 unfolded R-P66에 대한 1:20 refolding과 비교한 낮은 urea 농도 및 농축 R-P66 생산법은 일정한 결과를 얻기 어려웠다. 문제 해결을 위해, TFF filter system을 적용하였으며, 적용 system에서는 unfolded R-P66의 aggregation을 발생하지 않았다(그림 3-3-50). 0.4 M urea의 unfolded R-P66 회수율은 86%였으며, CaCl₂ 첨가 농도가 높을수록 refolding 속도가 빨랐다. 전체적으로 1:0 및 1:1 refolding은 4 ~ 5 시간 및 3 ~ 5 시간의 refolding 시간까지 70 ~ 76%의 잔존 단백질을 빠르게 감소시켰으며, 이후 잔존 단백질량의 감소 속도는 느려졌다(27시간 refolding 잔존 단백질 = 15 ~ 18%). 105 또는 135 mM의 CaCl₂을 첨가한 1:1 refolding은 3 M urea unfolded R-66의 1:20 refolding과 가장 유사한 총 활성을 나타냈다(92 ~ 93%). 흥미롭게도, refolding 17시간의 총 활성과 비교한 27시간 refolding 활성은 적은 잔존 단백질 양에 따라 대체적으로 감소 추세에 있었으며, 이는 고농도 R-P66의 auto-lysis의 영향으로 추론된다. 특히, 1:0 refolding은 1:1 refolding과 refolding 27 시간에서 유사한 잔존 단백질이 존재함에도 불구하고, 상대적으로 더 낮은 총 활성을 보유하여 auto-lysis를 고려할 필요가 있다. 1:0 및 1:1 refolding은 24 ~ 30%의 잔존 단백질 시기에 완료해야 할 것으로 판단되며(3 M urea unfolded R-66의 1:20 refolding 수율과 유사), 이후 auto-lysis를 방지할 수 있는 물질 첨가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

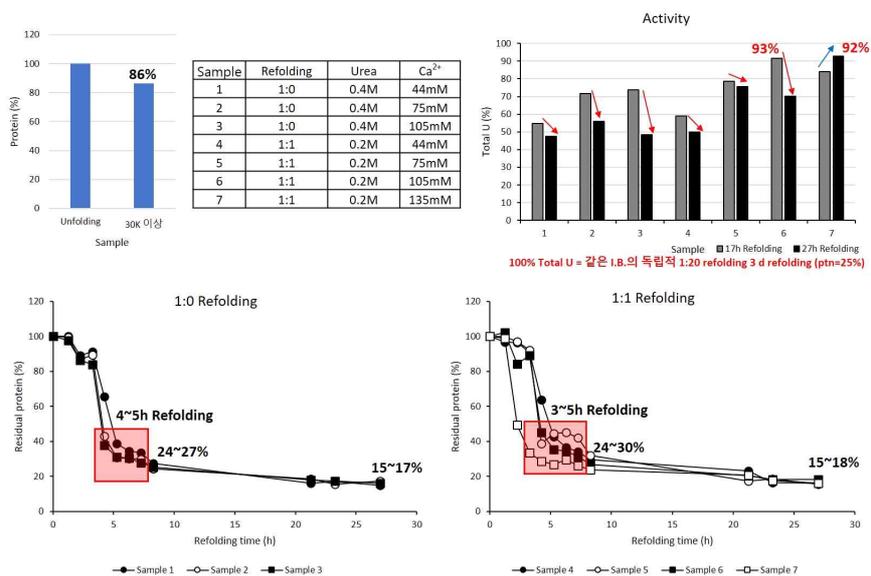


그림 3-3-50. TFF filter system을 이용한 urea 제거 및 refolding

(6) Refolding ②

위의 결과인 ‘Refolding ①’은 glycine buffer를 이용한 결과였으며, R-P66 생산을 위한 buffer는 NaHCO₃로 결정되었다. Glycine을 NaHCO₃로 대체한 urea 제거에서의 재현성 확인을 위해 0.4 M urea의 unfolded R-P66(×1 unfolded R-P66)을 획득하였으며, ×1 unfolded R-P66은 4배 농축(×4 unfolded R-P66)이 가능한 것을 추가 확인하였다(그림 3-3-51). 3 M에서 0.4 M urea로의 전환 단백질 수율은 100% 이상이었지만, ×4 unfolded R-P66의 회수율은 62 ~ 70%였다. 30 kDa 이하의 단백질은 0.1 ~ 0.5%로 측정된 것으로 미루어 4배 농축의 낮은 회수율은 membrane으로부터의 회수 문제로 판단된다. Buffer와는 관계없이 TFF membrane으로부터 회수율을 향상시켜야 농축 refolding은 더욱 현실화될 것이며, 회수는 glass fiber type filter 등을 이용하면 해결될 것으로 판단된다.

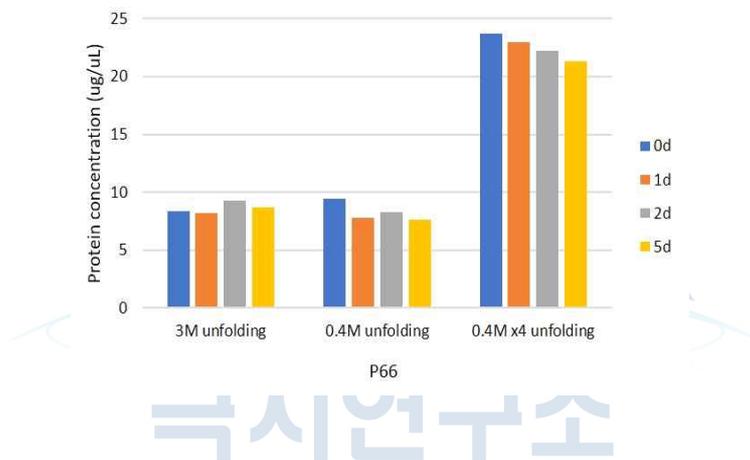


그림 3-3-51. NaHCO₃에서의 urea 제거 효율

×1 unfolded R-P66은 1:1 ~ 1:4의 refolding에서 16.8±0.6 unit의 총 활성을 보였다. 추가 refolding 용액 없이 CaCl₂ 첨가만으로 진행한 refolding(1:0 refolding)은 9 ~ 180 mM CaCl₂ 첨가 및 5 일 배양으로 refolding이 완료되었다. 9 ~ 54와 72 ~ 180 mM CaCl₂ 첨가 구간은 16.5±0.2 U/mg(15.2±0.6 total U)와 18.8±0.5 U/mg(12.1±1.0 total U)의 활성을 나타냈다. 1:0 refolding은 최소 9 mM CaCl₂가 첨가되어야 하며, 약 75 mM CaCl₂에서 refolding 속도가 빠른 것을 확인하였다. 또한 고농도의 CaCl₂ 첨가는 R-P66의 auto-lysis를 가속화하였다. 1:0 Refolding은 기존의 1:20 대비 약 21배 농축 R-P66 생산법으로 유용한 기술로 판단된다. NaCl, Tween 20 및 sucrose 등을 1:0 refolding에 추가 첨가로는 auto-lysis를 방지할 수 없었으며, 고농도의 NaHCO₃는 refolding을 방해하는 것으로 확인되었다. 고농도의 unfolded R-P66을 사용하는 만큼 잔존 단백질과 활성을 고려한 최고의 수율 지점을 결정하고, auto-lysis를 방지할 보존제를 최고의 수율 지점에 첨가하는 연구가 필요하다.

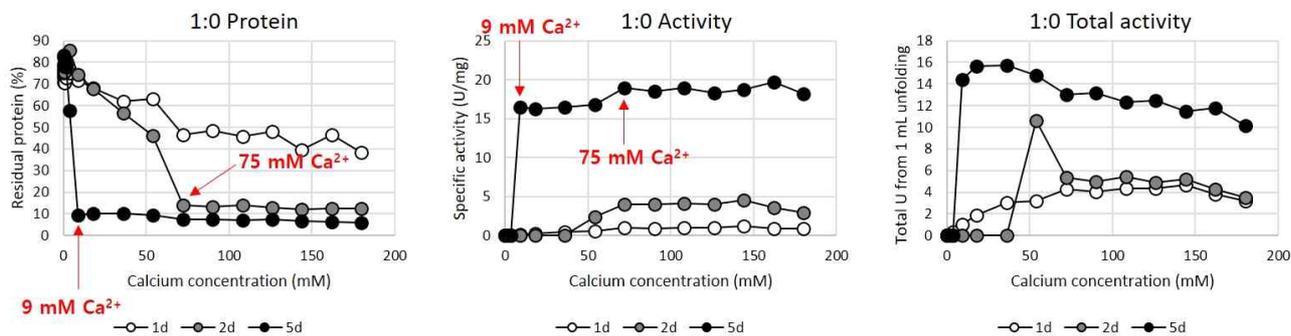


그림 3-3-52. NaHCO₃를 첨가한 urea 제거 refolding

Urea 제거는 CaCl₂ 첨가 또는 무첨가 조건에서 진행하여 ×1 및 ×4 unfolded R-P66를 제작하였다. ×1 및 ×4 unfolded R-P66의 회수율은 CaCl₂ 첨가에서 93 및 89.5%, CaCl₂ 무첨가에서 92 및 82.3%였다. ×1 unfolded R-P66의 1:0 refolding은 최종 75 mM의 CaCl₂에서 진행되었으며, ×4 unfolded R-P66의 1×4:0 refolding은 최종 다양한 CaCl₂ 농도에서 진행되었다. Refolding에 따라 모든 실험의 잔존 단백질과 총 활성은 시간 경과에 따라 감소하는 auto-lysis 현상이 발생하였다. Refolding을 위한 최종 CaCl₂를 동일하게 조정하였음에도 불구하고, CaCl₂ 첨가 또는 무첨가의 urea 제거는 refolding 효율에 큰 차이를 보였으며, CaCl₂ 첨가 urea 제거는 총 활성 측면에서 유리하였다. 1×4:0 refolding은 refolding 시 첨가된 CaCl₂ 농도에 따라 단백질 회수율이 낮아지는 것을 확인하였다.

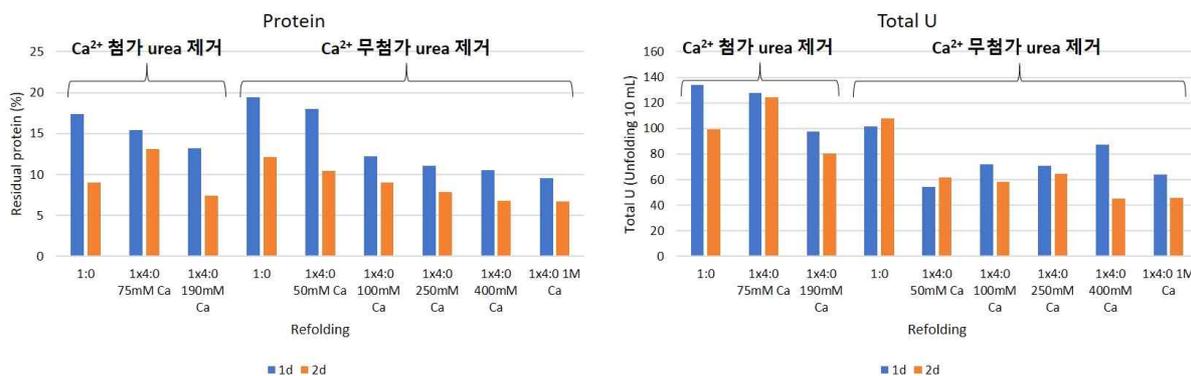


그림 3-3-53. CaCl₂ 첨가 또는 무첨가에서의 urea 제거 refolding

Urea 제거 및 농축된 unfolded R-P66 제조(TFF membrane 또는 Glass Fiber Filtration)는 R-P66의 산업적 refolding 생산에 유용하다. R-P66의 산업적 제조를 위해서는 효소액의 농축이 필수이며, 실제 산업 단백질분해효소인 Novozymes사의 Savinase[®]은 25 ~ 50 g/L의

subtilisin을 함유되어 있다. 기존의 연구에서 1:20 같은 높은 희석도의 refolding은 농축 지연을 발생시켰으며, 농축 속도에 따라 효소 회수율의 차이가 극명하게 나타났었다(133, 170 및 250 배 농축 시 약 33, 58 및 67% 효소 손실). 1:1, 1:0 또는 1×4:0은 1:20 대비 10.5, 21 및 84 배 농축 효소를 refolding 과정만으로 생산할 수 있다. Urea 제거 refolding은 고농도의 효소 생산에 의한 auto-lysis 발생도가 상대적으로 높지만, 1:1 refolding은 urea 제거 단백질 회수율의 조절에 따라 1:20 같은 높은 활성형 R-P66 생산이 가능하였다. 참고로, CaCl₂ 포함 희석액의 unfolded R-P66 용액은 최대 4배 농축이 한계점이었고, CaCl₂ 불포함 희석은 4배를 초과한 농축이 가능한 것을 확인하였다. 위의 실험에서 단백질분해효소의 auto-lysis는 지속적으로 발생하여 이를 방지할 방안 모색이 필요하다. 이를 극복할 수 있으면 84 배 이상의 농축 효소를 손쉽게 제조할 수 있을 것이다. 현재의 auto-lysis 방지 방안은 동결 또는 sucrose를 첨가한 동결 건조가 있지만, 근본적 해결책은 refolding 과정에 첨가할 물질 탐색으로 사료되며, 이를 위한 후속 연구를 진행할 필요가 있다.

4. R-P66 농축

가. Ammonium sulfate 침전

R-P66 농축은 ammonium sulfate 침전, 원심분리용 3 kDa cut-off membrane 농축 또는 동결건조로 진행하였다. R-P66 농축을 위한 30 ~ 70% 포화도의 ammonium sulfate 침전은 176 ~ 472 g/L(1.34 ~ 3.6 M) ammonium sulfate 첨가로 구성했으며, 30, 50, 60 및 70% ammonium sulfate에서 8, 43, 89 및 96%의 단백질이 침전되었다(그림 3-3-54). 각 포화도의 ammonium sulfate 침전 상층액과 침전물 재가용화 용액의 총 활성은 단백질 함량에 맞게 나타났다. '제 3 절 연구결과 4. 활성형 R-P66 생산 (6) Refolding ②'로 획득한 R-P66 대조군 1:0은 4℃, 2일 방치 및 이후 -80℃, 1일 방치 모두에서 단백질 함량과 효소 활성이 유지되었지만, 60 또는 70% 포화도의 ammonium sulfate 침전물은 4 또는 -80℃ 보관에서도 단백질 또는 총 활성이 낮아지는 auto-lysis 현상이 발생하였다. Ammonium sulfate 침전은 일반적으로 과도한 시약 사용 및 desalting 요구의 단점이 있으며, ammonium sulfate를 이용한 R-P66 침전은 auto-lysis를 가속화시켰다.

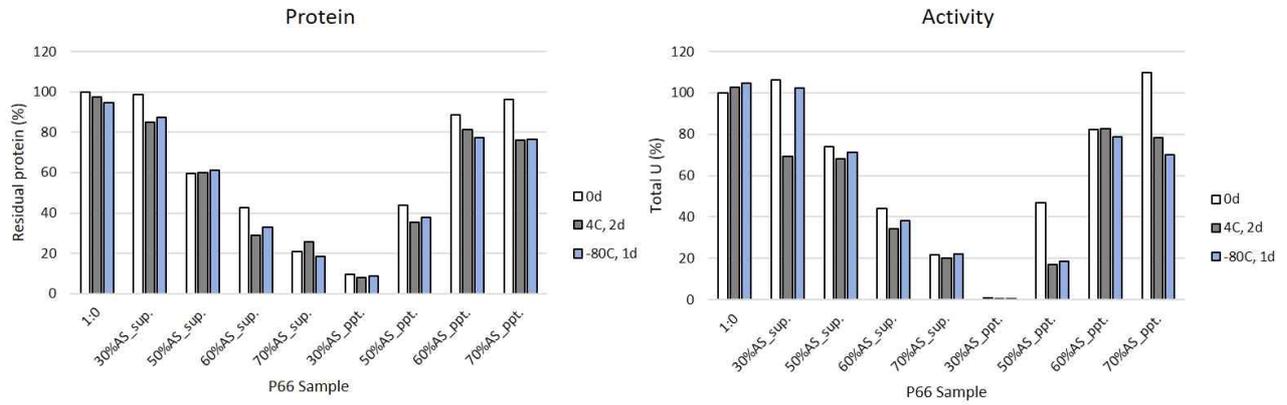


그림 3-3-54. Ammonium sulfate를 이용한 R-P66 농축

나. 동결건조와 cut-off membrane

R-P66의 농도와 3 kDa cut-off membrane 농축 시간은 효소 회수율에 깊게 관여하지만, 아직 한계 농도 및 농축 소요 시간을 명확히 하지 못했다. 현재까지 확인한 바로는 24 ~ 48시간 이하의 농축 시간에서는 적당한 효소 회수율을 유지하기 때문에, 1:20 희석법 같은 수분이 많은 R-P66 생산법은 효소 농축 측면에서 좋은 생산법이 될 수 없다. 1:20 희석법 보다 21배 농축 생산된 R-P66은 짧은 시간 내 농축과 반복되는 Freeze-Thaw cycle에서 90% 이상의 효소가 보존되는 것을 확인하였다(그림 3-3-55). Freeze-Thaw에서 안정한 R-P66은 동결건조로 63.7±8.3%의 효소가 회수되었으며, 총 효소 활성은 단백질 auto-lysis와 관련하여 66.9±16.1%로 확인되었다. 일반적으로 단백질의 동결 또는 동결건조는 단백질 주변 탈수에 의한 단백질의 불가역적 구조 변화가 발생하며, 이를 방지하기 위해서는 cryoprotectant를 동결 시 첨가해 주어야 하는 것으로 알려져 있다(Roy and Gupta, 2004).

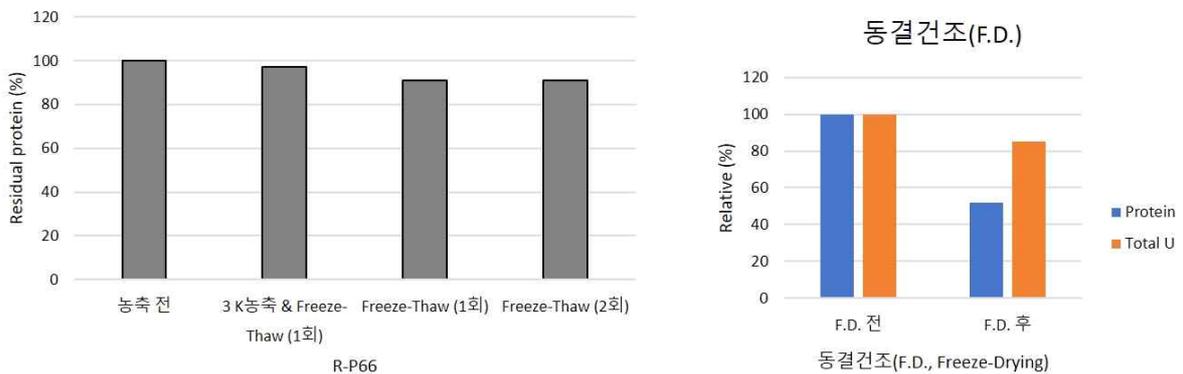


그림 3-3-55. 동결건조를 통한 R-P66 농축

R-P66은 일반적인 동결에 의한 단백질 손상보다는 동결건조 과정에 알 수 없는 단백질 손상이 발생하는 것으로 판단된다. 이는, 동결건조 시 sucrose를 첨가하여 방지할 수 있는 것을 확인하였다(그림 3-3-56). Cryoprotectant 중 하나인 sucrose의 첨가로 동결건조 R-P66의 효소의 손실은 방지되었는데, 약 660 mM의 sucrose를 통해, 112% 효소를 동결건조 회수할 수 있었으며, 효소 활성은 최대 208%까지 상승하였다. 1 M 이하의 sucrose 단독 용액은 Bradford 단백질 정량에서 O.D.595 = 0.02 이하였기 때문에, sucrose에 의한 단백질 정량 문제는 없는 것으로 판단된다. 참고로, 고함량의 15% glycerol과 15% propylene glycol은 동결건조용 cryoprotectant로의 사용이 불가하였지만, 1% glycerol과 5% propylene glycol을 첨가한 R-P66 동결건조는 가능한 것을 확인하였다. 하지만, 저농도의 glycerol과 propylene glycol은 R-P66의 동결건조에서의 단백질 손실을 방지하지 못했다.

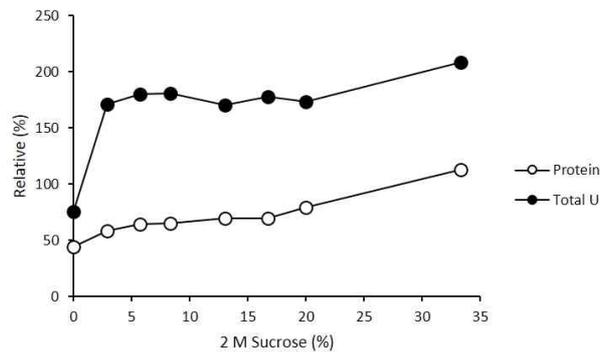


그림 3-3-56. Sucrose를 첨가한 R-P66 동결건조

R-P66을 3 kDa cut-off membrane으로 약 7.5배 농축하였다. 0.78 ug/uL 및 9.87 U/mg의 R-P66은 4.86 ug/uL 및 33.1 U/mg의 농축 효소로 전환되었는데, 단백질 농도 및 활성기준으로 농축 정도는 6.2 및 3.4배로 확인되었다. 7.5배의 농축을 위한 실험에서 6.2배 단백질 농축 회수는 원심분리용 filter로부터의 회수와 관련된 단순 문제로 판단되며, 단위 단백질 당 활성의 감소 문제는 반드시 해결해야 한다. 동결건조의 auto-lysis에 의한 효소 손실과 다른 filter 농축에서의 농축 후의 단백질 농도와 활성 사이의 차이는 Ca^{2+} 공급으로 해결되었다. R-P66의 농축에서 단백질량 손실 없이 단위 단백질 당 활성이 낮아지는 특이 현상은 R-P66과 연결된 Ca^{2+} 이 규명을 하지 못한 어떠한 원인에 의해 효소로부터 이탈한 것으로 판단된다. 유리 Ca^{2+} 은 수용액에서 R-P66과 재결합을 하지 않았으며, 추가 Ca^{2+} 공급으로 효소의 단위 단백질 당 활성이 회복되었다. 농축한 고농도의 R-P66(30 ug/uL)은 0.3 ug/uL의 효소 당 약 40 mM 이상의 $CaCl_2$ 이 공급되면 단위 단백질 당 활성을 회복하였다. 참고로, 25% glycerol과 25% propylene glycol을 첨가한 refolding 완료 효소액은 동결건조의 경우와 마찬가지로 filter 농축

의 효율성을 떨어뜨리는 것을 확인하였다. 집성의 효소 보존제는 최종 농축 완료 후 첨가되어야 할 것으로 판단된다.

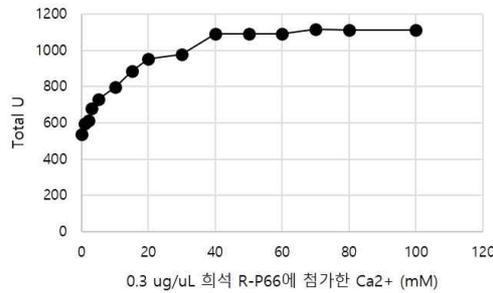


그림 3-3-57. Ca²⁺ 공급에 의한 R-P66 활성 회복

Ammonium sulfate 침전은 효소의 auto-lysis를 방지하지 못하며, 농축 효율의 문제가 있다. 현재까지의 연구에서 적합한 R-P66 농축법은 3-5 kDa cut-off filter membrane 사용 또는 동결건조로 생각되며, 이 두 가지 방법은 서로 장·단점이 존재하는 것을 확인하였다(그림 3-3-58). 동결건조와 filter를 통해, R-P66 농축액을 제조하였다. 1×4:0 R-P66과 660 mM sucrose 혼합액을 동결건조한 후, 11배 농축이 되도록 재가용화하면, 약 8.5배 농축 효소액을 얻을 수 있었으며, Ca²⁺를 공급한 단위 효소 당 활성은 18.3 U/mg으로 효소 활성은 102% 유지(100% = 18 U/mg, 동결건조 전 효소)되었다. Filter 농축의 경우, 16배 또는 12.5배 농축을 목표로 수행하여 15.2 및 12.1배 효소 농축액을 제조하였다. 두 종의 filter 농축의 Ca²⁺를 공급한 단위 효소 당 활성은 15.6 U/mg으로 약 90%의 효소 활성을 유지하였다(100% = 17.3 U/mg, filter 농축 전 효소). 결론적으로, 동결건조를 활용한 농축보다 filter 농축은 효소 회수에 유리하며, 활성 회복은 동결건조가 filter 농축보다 유리하여 두 가지 방법은 농축 기기의 처리 능력 등을 비교하여 선택해야 할 것으로 판단된다. 현재, 30 mg/mL 농도의 R-P66 효소액을 제조·보유하고 있으며, 이 효소액은 0.1 또는 0.01배 희석 사용에서 500 또는 50 mM CaCl₂를 첨가하면, 21.7-22.6 U/mg의 활성을 안정적으로 유지하고 있다.

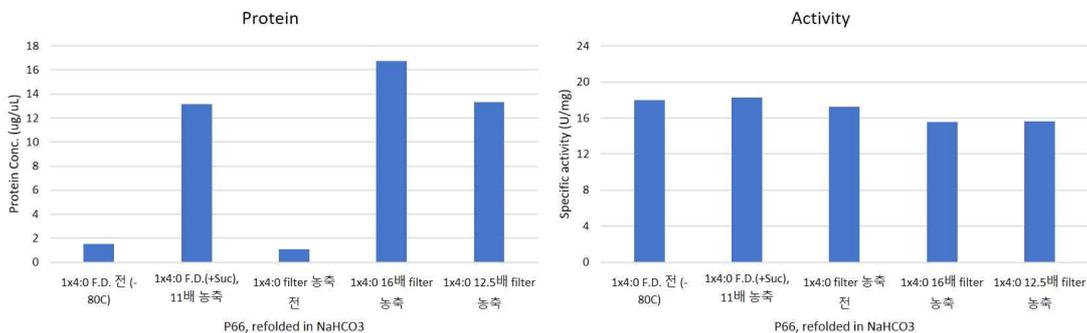


그림 3-3-58. 동결건조와 filter 농축의 R-P66

5. 보존제 탐색

가. Minitab

Novozymes사의 Liqunase[®] Evity[®] 같은 subtilisin은 알려지지 않은 합성물질을 보존제로 사용한다. Liqunase[®] Evity[®]를 100℃, 10 분 가열하면 효소 활성을 완전히 상실하였으며, 가열의 효소 불활성화 Liqunase[®] Evity[®] 또는 현재 상용화된 주방세제와 R-P66을 혼합한 37℃, 5 일 배양으로 R-P66은 최대 약 50% 효소만이 보존되었다. 따라서, R-P66에 적합한 보존제 조성은 보고된 효소 보존제들의 조합 또는 완전한 신규의 물질로 이루어져야 한다. 기존에 확립한 R-P66 보존제의 조성은 ① 25% glycerol+25% propylene glycol, ② 15 ~ 18% glycerol+15 ~ 18% propylene glycol+boric acid 또는 ③ 0.5 ~ 1 mM 4-formylphenyl boronic acid(4-FPBA)+3.3% propylene glycol+0.1% sodium formate+6% glycerol으로 ③의 조성은 37℃에서 28 및 42 일 방치로 82±7% 및 94±14%의 R-P66을 보존할 수 있다. 과도한 glycerol 과 propylene glycol 사용은 효소 농축에 문제를 일으키며, boric acid와 4-FPBA 같은 boron 함유물은 인체에 해로운 것이 알려져 새로운 R-P66 보존제 탐색이 필요하다. R-P66을 위한 보존제 조합 탐색을 위해, sucrose, glucose, glycerol, propylene glycol, ammonium Ca citrate, APG0810/1214, betaine, CaCl₂, cysteine, glycine 및 ammonium sulfate에 대한 보존제 조합 탐색을 Minitab 프로그램으로 수행하였다. 이 프로그램 이용한 Plackett Burman, 중심 합성법 및 Box-Behnken design과 이에 따른 R-P66 잔존 활성을 측정하여 최적의 R-P66 보존제 조합을 1차 결정하였다.

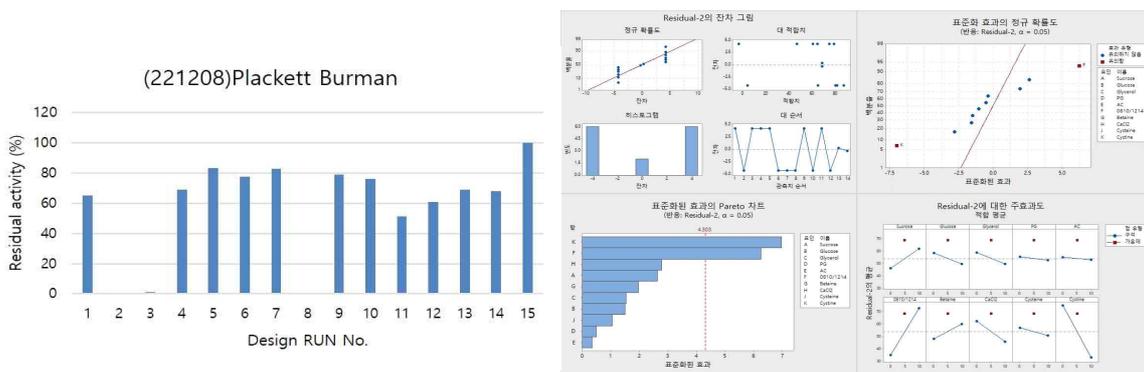


그림 3-3-59. Plackett Burman Design 시험 결과

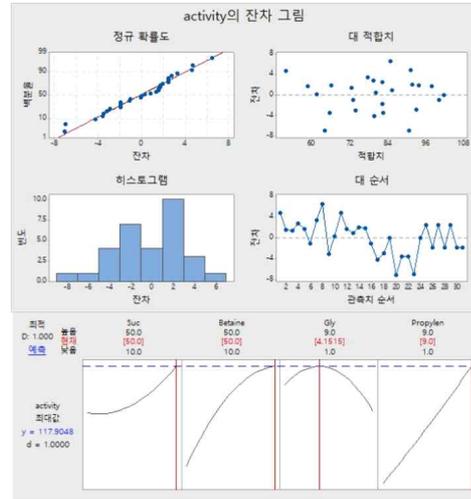
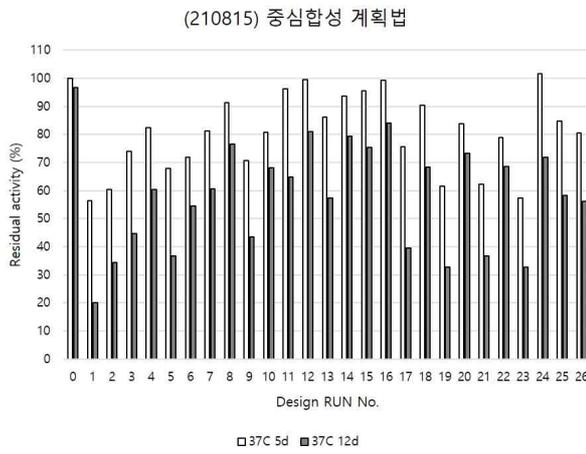


그림 3-3-61. 중심합성 계획법 시험 결과

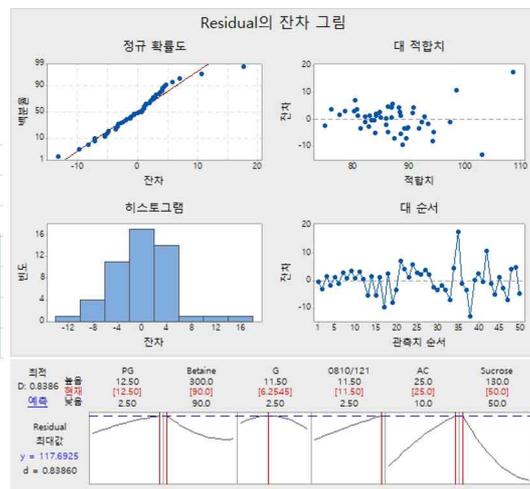
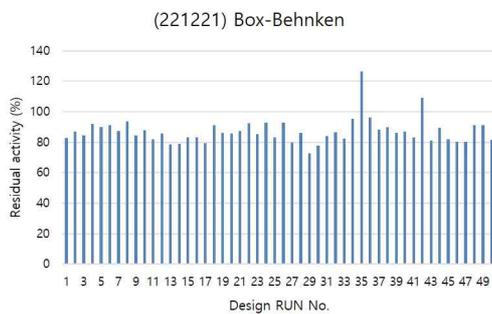
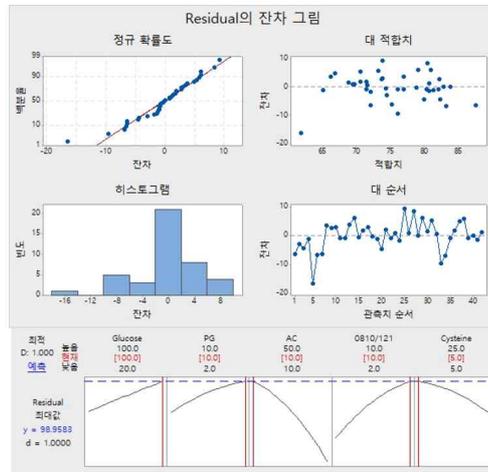
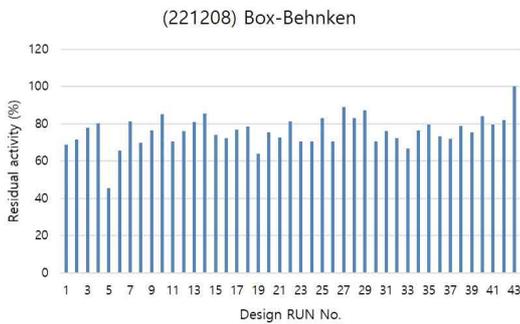


그림 3-3-61. Box-Behnken Design 시험 결과-1

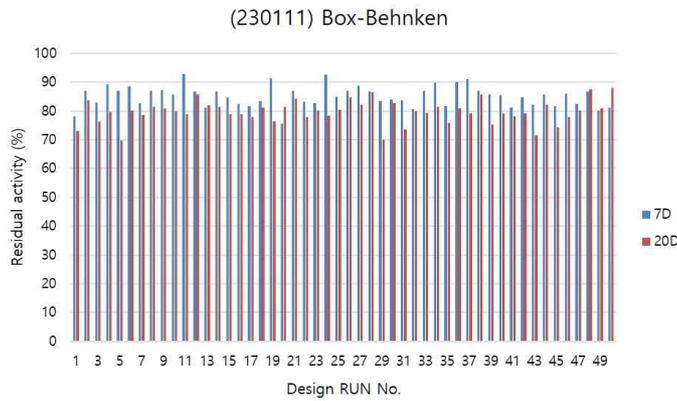
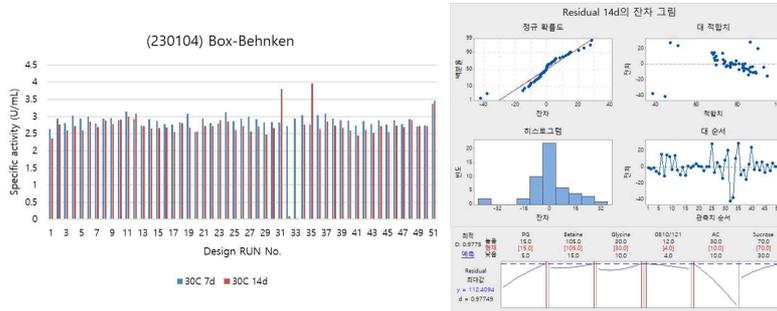


그림 3-3-62. Box-Behnken Design 시험 결과-2

230111의 Box-Behnken Design(그림 3-3-62)의 30°C, 28 일 방치 테스트 결과를 통해 R-P66 보존제 조합은 총 3 개의 상위 그룹으로 나눌 수 있었다(그림 3-3-63). 제 1 상위 그룹은 1-4의 하위 그룹이 속한 28 일 방치의 >75% R-P66 활성 보존이었으며, 제 2 및 3의 상위 그룹은 하위 그룹 5-10(>70% R-P66 활성 보존)과 하위 그룹 11-16(<70% R-P66 활성 보존)으로 나뉘었다.

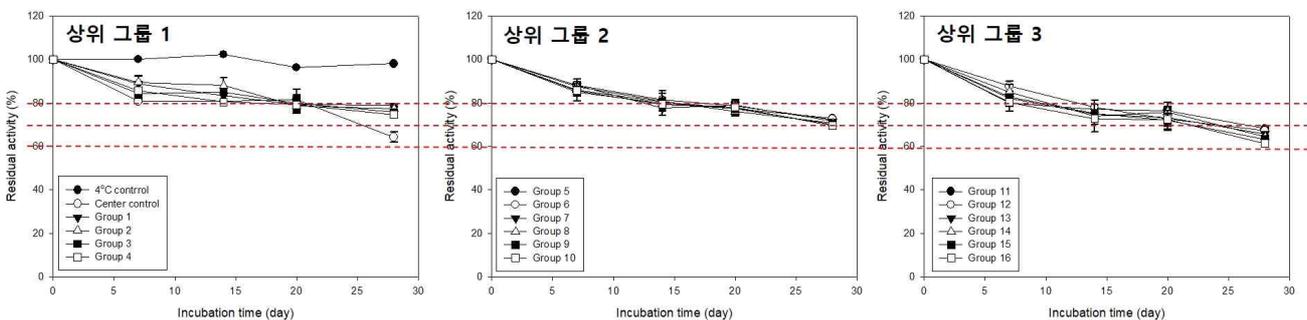


그림 3-3-63. Box-Behnken Design 시험군의 28일 보존 효과

Box-Behnken Design에 의한 각 하위 그룹의 보존제 후보 물질의 첨가량 차이를 비교하여 R-P66의 보존제로서 긍정적 또는 부정적 영향을 주는 물질을 선별할 수 있었다. Propylene glycol, betaine 및 sucrose는 R-P66 보존에 중요한 물질이었으며, glycine과 APG0810/1214(1:1의 비이온성 계면활성제)는 R-P66 보존 첨가물로써 사용이 권장되었다. Ammonium Ca citrate(AC)는 R-P66 보존제로서 부정적 물질로 확인되었는데, 이는 AC에 의한 효소액의 침전과 관련된 것으로 판단되어 AC의 침전 효과를 방지할 방안을 마련해야 할 것으로 판단된다.

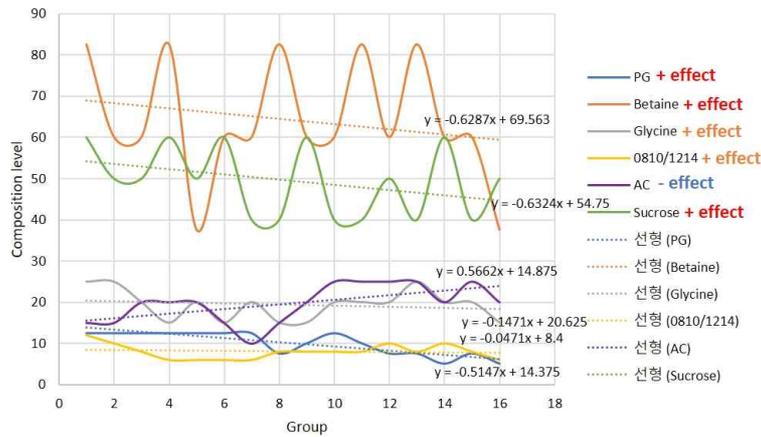


그림 3-3-64. 보존제 구성 물질들의 개별적 보존 효과 추정

나. 보존제 테스트

앞선 중심합성법과 Box-Behnken Design에 따라 얻은 Minitab의 예측된 R-P66의 보존제 조성을 사용하여 R-P66에 대한 4, 30 및 37°C에서의 28 일 보존 효과를 확인하였다(표 3-3-1).

표 3-3-1 R-P66를 위한 후보 보존제 조성

TEST NO.	Propylene glycol	Glycerol	Glucose	Sucrose	Betaine	APG08 10/1214	Ammonium citrate	CaCl ₂	Glycine	NaHCO ₃
1	16%	8%	100mM	40mM	60mM	10%	10mM	50mM	0M	20mM
2	18.5%	12%	0M	50mM	90mM	11.5%	25mM	50mM	0M	20mM
3	13.5%	13%	0M	50mM	95mM	7%	25mM	50mM	0M	20mM
4	18.5%	8.50%	0M	50mM	195mM	7%	17.5mM	50mM	0M	20mM
5	10%	7%	0M	50mM	57mM	8%	17.5mM	50mM	0M	20mM
6	15%	7%	0M	70mM	15mM	12%	10mM	50mM	30mM	20mM
7	15%	7%	0M	70mM	105mM	4%	10mM	50mM	30mM	20mM
8	5%	7%	0M	50mM	60mM	12%	30mM	50mM	20mM	20mM
9	10%	7%	0M	30mM	15mM	8%	30mM	50mM	20mM	20mM

각 온도의 독립된 3 반복 실험을 수행한 9 종의 테스트 조합에서 Test 1 및 7은 30°C, 28 일 동안 R-P66의 활성을 약 80% 이상 보존하였다. 특히, Test 1은 4°C에서도 효소를 안정적으로 보존할 수 있는 조합이었으며, 9 종의 테스트 조합 중 가장 뛰어난 37°C 효소 보존력을 나타냈다. Test 1의 보존제 조합을 중심으로 sodium formate, alaninamide, phenoxy ethanol 같은 추가 보존제 후보 물질을 첨가하면 R-P66의 37°C 효소 보존제로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

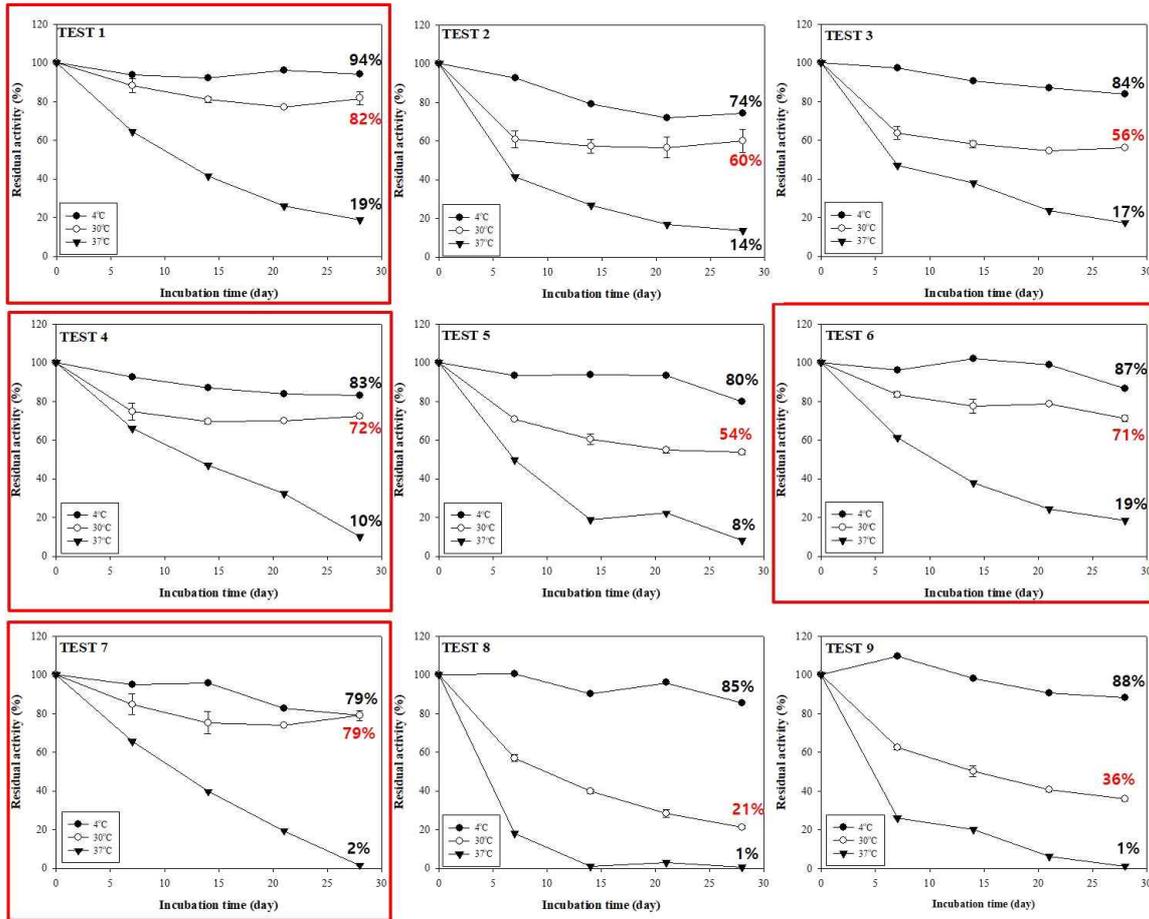


그림 3-3-65. 9 종의 보존제에서의 R-P66 열 안정성

6. R-P66의 산업 적용

가. 의류, 주방 및 의료용 세척제

Blood/Milk/Ink 및 Egg yolk 오염포에 대한 R-P66의 세척력을 의류 및 주방 세제 산업 적용 가능성으로 평가하였다. 보통 산업의 효소 세척·세정제는 다양한 계면활성제를 포함하는 화학물로 구성되어 있으며, 일반적으로 이 구성물들은 오염물 세척력의 주요 기능을 담당한다. 본 과제에서는 제품 내 화학물의 영향을 최소화하기 위해 효소와 일부 보존제 및 pH 조절

buffer 만을 첨가하여 세척력을 평가하였다. 주방 세제의 기능을 대변하는 egg yolk 오염포에 대한 R-P66의 세척력은 동량의 Savinase® 16L 보다 뛰어난 것을 확인하였다(그림 3-3-66). 이는 세척 후의 오염포 사진으로도 구별이 가능할 정도로, 모든 농도의 R-P66 처리 egg yolk 오염포 세척에서 잔류 오염물이 식별되지 않았다. 의류 세제를 대변하는 Blood/Milk/Ink 오염포에 대한 R-66과 Savinase® 16L의 세척력은 확인할 수 없었으며, 모든 농도의 Savinase® 16L은 egg yolk 오염포에 대한 세척력을 확인할 수 없었다.

오염포 세척력에 대한 정량적 세척력의 결과는 세척 후 오염포 내 오염포 잔류물 확인과 동일한 결과를 나타냈다(그림 3-3-67). 3 종의 오염포 모두에서 lipase 및 amylase에 대한 오염포 세척은 발생하지 않았으며, R-66과 Savinase® 16L은 Blood/Milk/Ink 오염포에 대한 세척력이 가장 낮았다. 두 protease 모두는 1:50의 첨가로 약 25%의 Blood/Milk/Ink 오염포 세척력을 보유했으며, 대체로 첨가 농도에 따라 세척력이 향상되었다. 특이하게도, Savinase® 16L은 Egg yolk(55 ~ 61% 세척력) 오염포에 대한 첨가 농도에 따른 세척력 향상이 확인되지 않았는데, 이는 25℃의 상온에서 효소의 적절한 기능이 활성화되지 않거나, 오염원에 대한 분해능이 낮은 결과로 생각된다. R-P66은 Egg yolk(74-78% 세척력) 오염포에서 Savinase® 16L 보다 뛰어난 세척력을 보였지만, 농도 기반 세척력 향상이 발현되지 않은 점은 1:200의 농도에서도 대부분의 오염원이 제거된 saturation에 의한 것으로 판단된다. 25℃의 상온에서 단백질 오염원에 대한 R-P66의 세척 기능은 저온에서도 기능을 할 수 있는 subtilisin으로 알려진 Savinase® 16L 보다 우수하여 R-P66은 의류 및 주방 세제의 첨가물로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 이를 위해서는 R-P66의 기능을 유지할 수 있는 제품 내 화학 첨가물 조성 연구가 필요하다.

Blood/Milk/Ink	R-P66	Savinase	R-P66 +Lipex+Stainzyme	Savinase +Lipex+Stainzyme
1:200				
1:100				
1:50				
Egg yolk	R-P66	Savinase	R-P66 +Lipex+Stainzyme	Savinase +Lipex+Stainzyme
1:200				
1:100				
1:50				

그림 3-3-66. Blood/Milk/Ink 및 Egg yolk 오염포 세척력-1

400 uL의 미국산 소고기 lysate에 800 ug의 PK(65°C, 45 분 처리)를 적용하여 12.15 ug gDNA를 획득하였으나, 800 ~ 1,600 ug의 R-P66(40°C, 45 분 처리)에 의해 추출된 gDNA는 4.9 ~ 5.2 ug이었다. 이는 단백질을 분해효소를 처리하지 않은 gDNA 추출(2.5 ug)보다는 높은 추출능이지만, R-P66의 처리량과 비례한 gDNA 추출이 되지 않았다. 또한, PK와 비교하여 R-P66에 의한 gDNA 추출은 37 ~ 65°C의 모든 온도에서 비효율적인 것을 확인하였다.

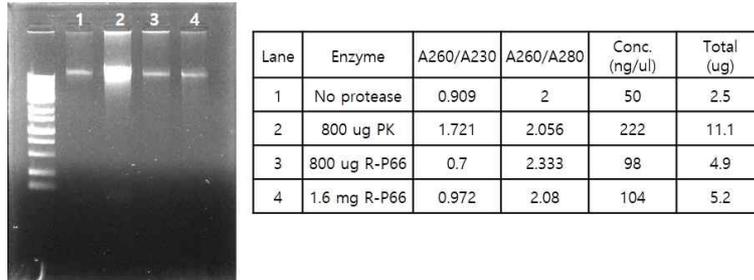


그림 3-3-69. 미국산 소고기 lysate gDNA 추출

PK와 비교되는 R-P66에 의한 비효율적 gDNA 추출은 다음의 원인에 기인한 것으로 판단된다: ① R-P66에 의해 histone이 제대로 분해되지 않음, ② R-P66의 활성을 저해하는 buffer 조건. 일반적으로, DNA 및 RNA 추출 Kit는 cell resuspension & lysis 단계에서 단백질을 분해효소를 사용하며, 이 단계의 구성물은 EDTA, 계면활성제, RNase(또는 DNase) 및 guanidine-HCl 같은 강력한 단백질 변성제 등이 있다. R-P66은 EDTA buffer(Kit 내 실제 사용 농도인 resuspension buffer; 134 mM EDTA, 10% Tris-HCl, 5% sodium lauryl ether sulfate, 10% NaCl)에 의해 30 분 이내에 50% 이상의 효소 활성을 상실하며, Guanidine buffer(Kit 내 실제 사용 농도인 resuspension buffer; 2.6 M guanidine-HCl, 20% sorbitan oleate, 5% Tris-HCl)에 의해 1 분 이내에 효소는 대부분 불활성화되었다(그림 3-3-70). 현재까지 파악된 시판 Kit의 resuspension buffer 구성물 중 R-P66의 활성에 관여하지 않는 것은 Tris-HCl 뿐이었으며, PK는 EDTA buffer 및 Guanidine buffer에서 60 분 이상 안정하였다. gDNA 추출능에서 차이를 보이는 R-P66과 PK는 상기의 resuspension & lysis buffer에 대한 안정성과 관련된 것으로 판단되며, R-P66의 gDNA 추출 영역 사용을 위해서는 R-P66에 적합한 buffer 조성 연구를 필수적으로 수행해야 한다.

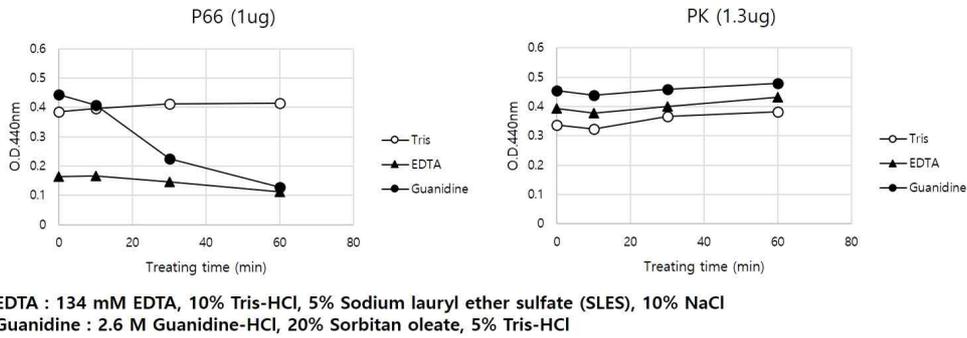


그림 3-3-70. Kit 구성물질에 대한 R-P66과 PK의 안정성

(2) RNA 추출

PK의 활성을 고려한 65°C 같은 고온에서 RNA 추출은 핵산의 온도 불안정성의 문제를 갖고 있다. 이를 해결하기 위해, R-P66 적용 mammalian 또는 세균 세포 RNA 추출을 수행하였다. Mouse mammalian 세포에 Trizol 매뉴얼 및 PK 사용 또는 미사용 RNA Extraction Kit를 적용한 RNA 추출은 PK 또는 R-P66 적용과 무관한 결과를 나타냈다. 특히하게도, PK를 사용한 Viral RNA Extraction Kit에 의한 mammalian 세포는 다량의 gDNA가 검출되었는데, 이는 PK에 의한 DNase 분해의 결과로 생각된다.

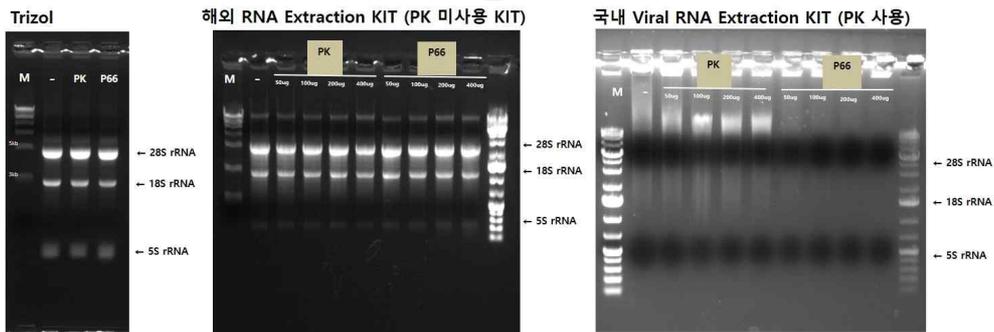


그림 3-3-71. Mouse mammalian 세포 RNA 추출

Mammalian 세포의 RNA 추출과 마찬가지로 *E. coli* 세포에 대한 PK와 R-P66의 상온에서의 RNA 추출은 두드러진 차이를 보이지 않았다(그림 3-3-72). 앞선 gDNA 추출에서와 같이 Kit를 구성하는 화학물과 R-P66의 구성 조합의 연구가 필요하다. RNA 추출에 있어서 PK는 고가이며 DNase 분해에 따른 gDNA impurity를 생성하는 단점을 갖고 있다. R-P66의 구성 조합의 연구를 완료하면, 저가이면서 고순도 RNA를 추출할 수 있는 R-P66의 핵산 추출 영역 진입이 가능할 것으로 판단된다.

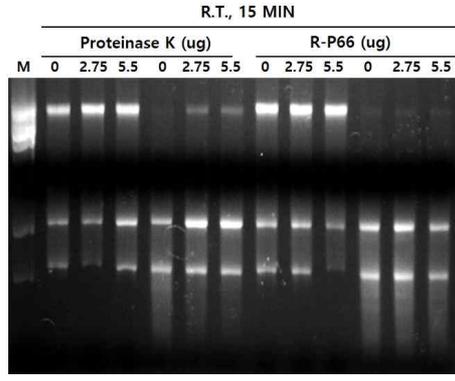


그림 3-3-72. *E. coli* RNA 추출

R-P66을 활용한 gDNA 또는 RNA 추출에서 활성을 저해하는 물질 중 하나인 EDTA에 대한 R-P66의 한계 내성 농도를 확인하였다(그림 3-3-73). R-P66은 100 mM EDTA 처리 즉시 80%의 효소 활성이 손실되며, 손실된 활성은 100 mM CaCl₂ 이상에서 약 50%의 효소 활성이 회복되었다. 하지만, 회복된 활성은 임시의 활성 회복으로 결국 100 mM EDTA에서 R-P66은 완전히 불활성화되는 것을 확인하였다. 0 ~ 50 mM EDTA 처리 직후 활성을 보존하는 R-P66은 3 일 방치로 효소 활성 손실이 발생하여 15 mM 이하의 EDTA에서만 70% 이상의 효소 활성을 유지하였다. 결론적으로, EDTA에 의해 효소 활성이 손실된 R-P66은 CaCl₂ 투입으로 효소의 재활성화를 할 수 없으며, R-P66+EDTA에서의 효소 활성은 즉시 사용 시 50 mM 이하의 EDTA를 사용해야 하며, 방치 후 사용은 15 mM 이하의 EDTA 농도로 제한되어야 한다. 참고로, 15 mM의 EDTA에 의해 손실된 R-P66은 100 mM CaCl₂ 공급으로 효소 활성이 100% 회복되는 것을 확인하였다. 현재의 gDNA 또는 RNA 추출 Kit는 100 mM 이상의 EDTA를 세포 resuspension & lysis 과정에 사용하고 있으며, R-P66의 비효율적 추출능 결과의 원인 중 하나는 EDTA인 것으로 판단된다. 단백질 변성제와 EDTA 등의 농도를 조절하는 구성 연구가 이루어지면 R-P66은 gDNA 또는 RNA 추출에 활용될 수 있을 것이다.

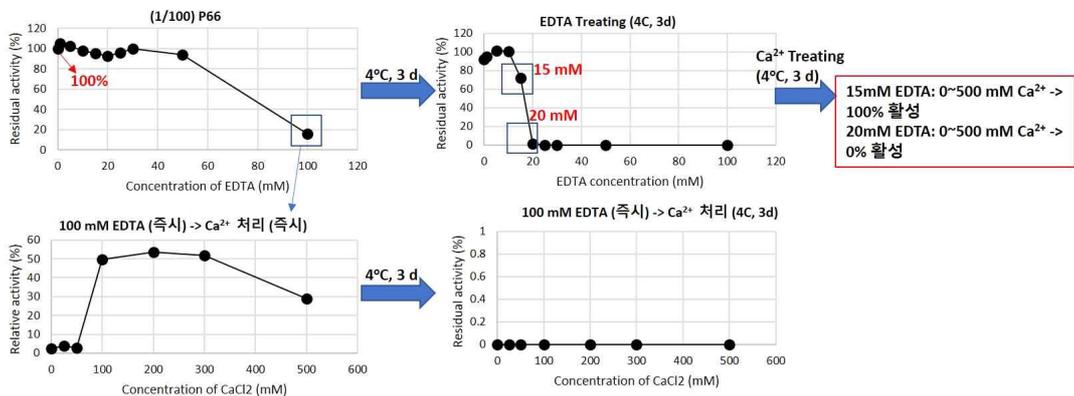


그림 3-3-73. EDTA에 의한 R-P66의 활성 손실

(3) 분자진단

분자진단의 대표적인 예는 COVID-19 감염 진단으로, 감염 진단은 채취한 시료를 viral transport media에 resuspension한 후, viral RNA 추출 및 qRT-PCR 분석 과정으로 이루어진다. Viral RNA 추출을 위한 현재의 Kit는 고농도의 단백질 변성제(guanidine-HCl)와 PK를 포함하고 있기 때문에, RNA 정제 과정을 필수로 거쳐야 하며, 이는 분자진단의 bottleneck으로 여겨지고 있다(Esbin et al., 2020). 바이러스 감염 진단의 신속성을 위해 'Direct-to-Test' 방법 개발이 요구되었고, 이를 위한 현재의 개발 방향은 단백질 변성제 사용 없이 단백질분해효소 첨가량을 늘리거나 물리적인 방법으로 바이러스를 효율적으로 파쇄하여 RNA 정제 과정 없는 qRT-PCR 분석법의 개발이다. 물리적인 바이러스 파쇄는 가열 또는 magnetic bead 등을 활용하는 다양한 기기를 요구하는 경제적 단점과 RNA의 불안정성 증가 또는 RNA 회수율 감소의 단점을 갖고 있다. 단백질분해효소의 양을 늘리는 방법은 단백질 변성제를 대신할 화학물 탐색을 요구하며, 효소와 화학물은 reverse transcriptase와 DNA polymerase에 영향을 주지 말아야 한다.

환경부 지침에 따른 COVID-19 살균제의 살균 유효농도는 0.05 ~ 1% 차아염소산나트륨, 0.23% 아염소산나트륨, 70 ~ 90% ethanol, 50% isopropanol, 0.05 ~ 0.5% 벤잘코늄염화물, 0.5% 과산화수소, 0.26% 과아세트산 또는 0.12% 크로록실레놀이다¹⁷⁾. 이를 참조하여 본 연구에서는 ethanol을 바이러스 파쇄물로 상정하여 연구를 진행하였다. PK와 R-P66 모두는 70% ethanol에서 안정하였으나, ethanol을 효소 반응 용매로 사용하였을 때 PK의 활성은 약 50% 감소하였고, R-P66은 70% 이상의 활성을 나타냈다(그림 3-3-74). 따라서, ethanol을 바이러스 파쇄물로 사용할 때 R-P66은 PK 보다 바이러스 envelop protein 및 RNA 주변 단백질 분해에 유리할 것으로 판단된다. PK는 qRT-PCR 분석 과정에서도 민감도를 낮출 수 있는 물질로서 분석 전에 제거되어야 할 것으로 판단된다. 이는 PK의 reverse transcriptase와 DNA polymerase에 대한 분해 활성과 관련된 것으로 SDS-PAGE에서 PK는 약 75 kDa의 두 qRT-PCR 효소를 상온에서도 분해하는 것이 확인되었다. qRT-PCR 효소들은 R-P66에 의한 변성 또는 분해되지 않는 것으로 보여졌다.

17) 코로나19 살균·소독제품의 안전한 사용을 위한 세부지침, 환경부 화학제품관리과

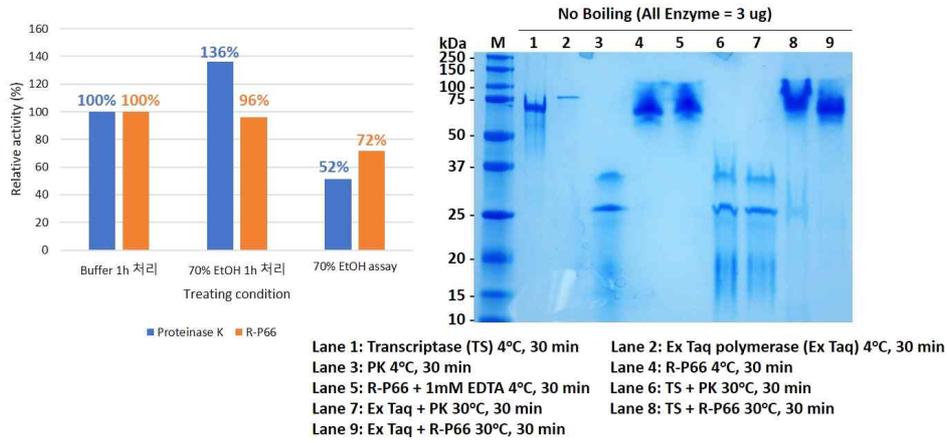


그림 3-3-74.

Ethanol에 의한 PK와 R-P66의 활성 변화 및 PK와 R-P66의 qRT-PCR 효소 분해능

Ethanol, 0.1 ~ 3 ug PK 및 0.1 ~ 3 ug R-P66이 포함된 상태에서 mouse total RNA의 cDNA를 합성과 qRT-PCR을 분리하여 진행하였다. 가열 불활성화된 PK의 Ct 값은 21.7로 positive control(Sample 1, D.W.)와 유사하였고, 약 20 cycle부터 증폭되는 민감도를 보였다. 활성형 PK와 ethanol은 첨가량에 따라 Ct 값이 증가하여, qRT-PCR 반응에 부정적 영향을 미쳤다. R-P66은 PK 보다 낮은 Ct 값을 보였지만, positive control 보다 낮은 증폭 민감도를 나타냈다. Ethanol은 30 ~ 32의 높은 Ct 값을 포함하여 증폭량도 낮아 reverse transcriptase와 DNA polymerase 모두에 영향을 끼치는 것으로 판단된다. 합성된 cDNA agarose gel에서 3 ug R-P66은 가열 불활성화에도 불구하고 cDNA 합성이 이루어지지 않았는데, 이는 R-P66이 함유한 Ca²⁺에 의한 reverse transcriptase의 기능 저해로 판단된다. Reverse transcriptase와 DNA polymerase는 기능 활성을 위해 Mg²⁺을 요구하는데, R-P66의 Ca²⁺에 의한 metal 이온의 경쟁적 inhibition이 발생하는 것으로 판단되며, Ca²⁺를 선택적으로 잡아내는 킬레이트제인 4 mM EGTA에 의한 효과는 확인할 수 없었다.

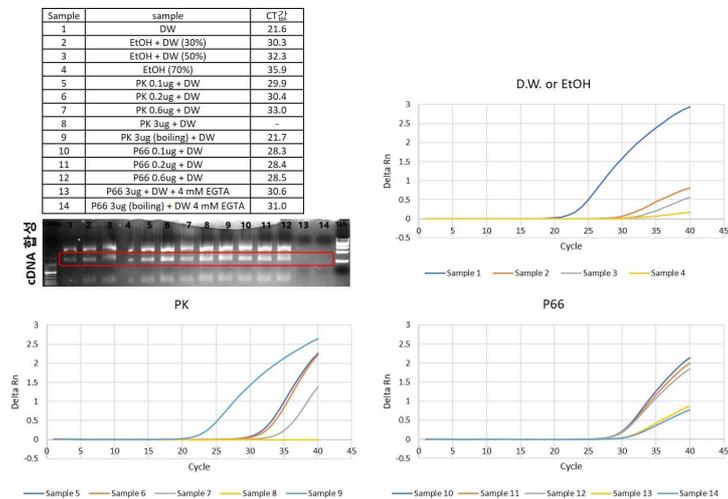


그림 3-3-75. PK 또는 R-P66 존재하에서의 Two step qRT-PCR

cDNA 합성과 PCR을 동시에 진행하는 Kit인 BioLabs Luna[®] Universal One-Step RT-qPCR Kit를 사용하여 mouse total RNA의 GAPDH gene을 증폭하였다. cDNA 합성과 PCR을 독립적으로 수행한 결과와 마찬가지로 3 ug의 R-P66 내 Ca²⁺에 의해 cDNA 합성 또는 PCR 저해현상이 발생하였지만, 0.1 ~ 0.6 ug의 R-P66은 positive control과 유사한 21 ~ 22의 Ct 값으로 target gene을 검출하였다. 불활성화된 PK만이 positive control과 유사한 증폭 민감도를 보여 현재의 분자진단 시장이 요구하는 one-Step qRT-PCR에 PK를 활용하기는 어려울 것으로 보인다. 0.1 ~ 0.2 ug의 R-P66은 one-Step qRT-PCR에 사용 가능하여 R-P66 내 Ca²⁺에 의한 reverse transcriptase와 DNA polymerase 활성 저해 문제를 해결한다면, 분자진단을 위한 고농도의 R-P66 사용이 가능할 것으로 판단된다.

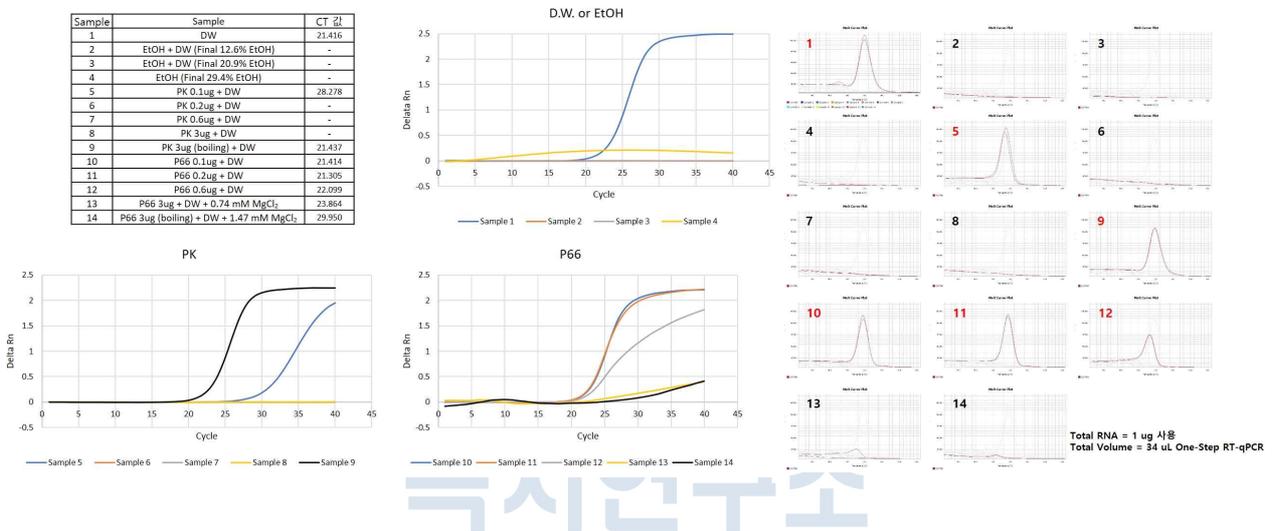


그림 3-3-76. PK 또는 R-P66 존재하에서의 One step qRT-PCR

제 4 절 고찰

전 세계의 효소 시장에서 가장 큰 규모를 차지하는 단백질분해효소는 세계 산업, 감염 진단 및 R&D, 주방 세정제, 의료기기 세정제 등 수많은 분야에서 상용화된다. 환경 친화적 산업의 개발 요구에 따라 현재의 산업에서 활용되는 중·고온성 단백질분해효소를 저온성 단백질분해효소로 대체할 필요성이 증가하고 있다.

남극 해양 세균인 *Pseudoalteromonas arctica* 유래의 저온성 단백질분해효소 R-P66은 극지연구소에서 수행한 기존의 연구를 통해 높은 정제도 및 경제성의 장점을 보유한 바이오신소재인 것이 밝혀졌다. R-P66의 상용화 기초 자료를 확보하기 위해 본 과제에서는 상용화 대량생산 시스템을 규명 및 저온성 효소의 보존제 탐색과 저온성 효소의 시장 활용 가능성을 검증하였다.

R-P66 생산을 위한 3 종의 재조합 대장균 발효 조건을 확립했다. 2 종의 산소 사용 발효 조건 확립으로 O.D.600nm = 42 및 105로 성장하는 각 발효 조건의 재조합 대장균은 O.D.600nm = 281 및 242의 성장하게 되었고, 1 종의 산소 미사용 발효 조건 조절로 O.D.600nm = 106으로 성장하는 재조합 대장균은 O.D.600nm = 161로 성장할 수 있었다. 산소 미사용 발효 조건을 도입한 상용화 발효는 O.D.600nm = 102-145로 성장하여 R-P66의 상용화 생산을 구체화하였다. 상용화 발효, I.B. 추출법 개량 및 unfolding/refolding 방법 개선을 통해, 현재 3 kL 발효로 약 7.4 kg의 R-P66 생산이 실증되었으며, 산소를 사용하는 상용화 발효를 수행하면 R-P66 생산량은 더 증가할 수 있을 것으로 예상된다.

R-P66의 산업화를 위한 보존제 조성 연구의 성공과 현재의 산업용 subtilisin 효소보다 뛰어난 세정력의 기초 자료를 확보하여 추후 연구를 수행할 수 있는 근거를 확보하였다. 또한, proteinase K 같은 고가의 정제 효소가 사용되는 산업으로의 진입 근거를 마련하였다. R-P66의 의류 및 주방 세제와 분자진단 산업을 포함한 다양한 산업 진입 노력과 지속되는 R-P66의 생산성 개선 및 산업에 맞는 기능 개선 연구 수행은 타 저온성 효소의 발굴 및 개발을 가속화할 것이다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구목표 및 연구내용

1. 연구개발의 최종 목표

극지 고유생물 유래 산업용 저온효소 상용화를 위한 생산공정 시스템 규명 및 활용 검증을 통해 남극 해양의 *Pseudoalteromonas acrtica* PAMC 21727 유래 저온성 단백질분해효소 R-P66의 상용화에 대한 사전 준비

2. 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용	연구범위
1차년도 (2021)	상용화 대량생산 시스템 규명	○ 최적 대량생산 공정 시스템 규명	○ 공정 생산균주 개발, 3,000 L 급 발효 생산 및 refolding 생산조건 확립
	상용화 저온효소 보존제 규명	○ 저온효소 상용화 보존제 조 건 개발	○ 30 또는 37℃ 28일 효소 불 안정화 조건에서의 75% 이 상 효소 안정화제 탐색
	저온효소 활용 검증	○ 진단키트용(diagnostic kit for the detection of the infection of the virus) 단 백질 분해효소 활용 검증 ○ 의료용 세척제(cleansing solutions for medical use) 첨가용 단백질 분해효소 활 용 검증 ○ 의류용 세제(detergent for clothes) 첨가용 단백질 분 해효소 활용 검증	○ Proteinase K 또는 subtilisin 을 대체할 수 있는 세탁세 제, 주방세제 또는 의료용 세정제 및 진단키트용으로의 활용 검증

제 2 절 연구목표 및 평가착안점에 근거한 목표 달성도

구분	년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도	달성도
1차년도	2021	상용화 대량생산 시스템 규명	60%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공정 생산균주 개발(1건) ○ 3,000 L 급 발효생산(1건) ○ Refolding 조건 확립(1건) 	100%
		상용화 저온효소 보존제 규명	10%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 30 또는 37℃ 28일 효소 불안정화 조건에서의 75% 이상 효소 안정화제 조성 제조(1건) 	100%
		저온효소 활용자료 확보	30%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 진단키트용 단백질 활용 검증(1건) ○ 주방 세제용 단백질분해효소 활용 검증(1건) ○ 의류용 세제용 단백질분해효소 활용 검증(1건) 	100%

극지연구소

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 기술적 측면

- 남극 해양 세균 *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717의 저온성 단백질분해효소 R-P66의 대량생산 시스템을 구축하고자 하는 본과제의 기술은 다양한 생명공학적 방법(예, 재조합 대장균 발효, 단백질 refolding, 효소 안정화제 탐색 등)의 상용화 적용 과정을 제시
- 대장균 발효는 높은 효율성으로 재조합 단백질을 생산하는 장점이 있으나, 3,000 L 같은 대용량 고밀도 대장균 생산발효는 다량의 거품 발생 등의 문제점이 존재하여 단백질 생산 재현성이 떨어짐
- 본과제의 5,000 L 발효기 사용은 3 L 발효 결과와 유사한 재조합 대장균 성장 결과를 보여 저온성 효소를 포함한 재조합 단백질의 상용화 생산을 위한 대용량의 재조합 대장균 발효 기술을 구체적으로 제시함
- 다양한 숙주에서 생산되는 재조합 단백질의 정제는 고가의 정제 장비와 소모품을 요구하면서도 낮은 회수율 및 비경제성의 단점이 존재하는 반면, 단백질 생산의 부산물 또는 폐기물로 여겨지던 inclusion body의 본과제와 같은 refolding은 높은 정제도의 경제적 재조합 단백질 생산이 가능함
- 저온성 효소의 열 불안정성은 저온성 효소의 상용화를 저해하는 문제였으며, R-P66 역시 30℃, 1시간에서 약 56%의 효소 활성이 손실되었으나, 30℃, 28일 동안 80% 이상의 R-P66을 안정화하는 제제를 연구하여 저온성 효소의 열 안정화 방법을 제시함
- R-P66의 대량생산 시스템 규명과 안정화제 연구로 저온성 효소의 상용화를 저해하는 근본적 문제의 해결 방안을 제시하였으며, 이는 전 세계적으로 요구하는 저온성 효소 개발을 진전시키는 데 도움이 될 것으로 사료됨
- R-P66의 세탁 세제, 의료용 세정제 및 분자진단의 용도 적용 시험으로 다양한 단백질분해 효소 사용 산업으로의 저온성 효소의 진입 가능성을 제시함

2. 경제·산업적 측면

- 저온성 효소는 바이오신소재로서 활용도가 매우 높은 새로운 유용 생물자원으로 여겨지며, 저온성 단백질분해효소는 주방용·세탁용 세제 산업 및 식품 산업 영역 등에서 상당한 산업

적 이점을 제공함

- 저온성 단백질분해효소 R-P66의 세제, 의료용 세정제 또는 분자진단 산업으로 진입하면, 저온성 단백질분해효소를 포함한 다양한 저온성 효소의 개발 및 산업 진입이 가속화될 것이며, 에너지 절감 및 친환경 산업으로의 산업 구조 변화가 이루어질 것으로 기대됨

3. 활용계획 및 추가연구 필요성

- 극지연구소는 저온성 단백질분해효소 R-P66을 연구소기업인 (주)크라이오텍으로 2021년 7월에 기업이전이 완료되었으며, “전용실시권 (5년)”의 특허이전 조건으로 대량생산 시스템, 제품화 구성, 활용연구를 양 기관이 공동으로 진행함
- 본 연구를 통해 획득한 연구결과를 (주)크라이오텍에 제공하고, (주)크라이오텍은 R-P66 생산 및 산업 진입을 위한 추가 공동 연구를 진행하여 산업 진입 제품을 생산함
- R-P66 생산을 위한 발효, refolding 및 안정화제 연구와 세제 산업 진입을 위한 추가 연구가 필요하며 이 연구는 지속적으로 수행할 필요성이 있음
- R-P66의 발효 대량생산에서 산소의 주입과 관련된 생산성에 대한 자료 수집과 refolding의 수율 향상 방안을 연구하여 R-P66의 생산성 향상을 달성하면, 저온성 효소의 산업 진입이 용이해짐
- 단백질분해효소가 첨가된 산업품들은 다양한 화학물 조성으로 구성되어 있으며, R-P66을 위한 적절한 화학물 조성 또는 조건 등의 연구 결과는 부족함.
- 실제 산업품들을 고려한 R-P66 최적의 활용 화학물 조성 연구는 R-P66뿐만 아니라 향후 개발될 다양한 저온성 산업 효소들에게 제품화를 위한 고려할 사항 점검의 좋은 예시가 될 수 있음

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 대장균 발효는 대부분 유가식 발효였으나, 최근에는 공간과 발효 시간 측면에서 수율 개선 및 생산 품질 지속성의 장점을 보유한 continuous 발효(Chemostat) 생산이 증가하고 있음
- 단백질 refolding에 문제는 대용량의 refolding 탱크 및 buffer, unfolding의 불균일성, 낮은 refolding 수율 등이 있으며, 이를 제어하는 데에 Quality by Design 도입이 필요하며, online process analytical technology (PAT)를 조합해야 하는 것이 제안됨
- 세계에서 가장 경제적인 단백질분해효소의 하나인 Savinase[®]은 pH 9.5 이상의 알칼리 조건에서 사용을 권장하지 않으며, pH와 온도뿐만 아니라 음이온 계면활성제와 표백제에서의 안정화를 위해 methionine, calcium binding site 및 disulfied bond가 도입된 효소임
- Savinase[®]의 2.5 ~ 5%의 비정제 subtilisin이 포함된 제품으로 하위 액상 효소제는 Savinase[®]L Savinase[®]Ultra 및 Savinase[®]Evity[®]이 있으며, 각 액상제는 10 ~ 50% glycerol와 10 ~ 50% propylene glycol 및 1 ~ 10% sodium formate이 첨가되어 있음
- Savinase[®]Ultra 및 Savinase[®]Evity[®]는 1% 미만의 alaninamide가 추가 포함되어 있으며, Savinase[®]Ultra에는 1 mM 4-formylphenyl boronic acid가 추가 첨가하여 효소를 안정화함
- Savinase[®]은 일반 보관에서 1 년 이상 90% 이상의 효소 활성이 유지되나 detergent 내 일반 보관으로 16 주 동안 약 40%의 효소 활성이 손실되며, detergent 내에서의 30℃ 보관으로 Savinase[®] 및 Savinase[®]Ultra는 약 70% 및 85%의 효소활성을 유지함
- 고품 효소제는 액상보다 높은 안정성을 부여하나, 고품 효소제 제작에 사용되는 TiO₂는 최근 발암물질로 분류되어 사용이 금지되었으며, 액상 효소제에 주로 사용되는 boron 함유 화합물은 유산 또는 기형 유발로 EU에서는 사용이 금지됨
- 미국에서 가장 높은 시장 점유 세탁 세제인 Tide는 sodium borate가 첨가되어 있으며, Novozymes는 boron 사용이 제한된 상황에서도 boron 첨가 액상 효소제를 판매함
- DNA 및 viral RNA 추출과 관련된 시약들은 proteinase K 존재 연부와 관계없이 실사용 기준 2.6-4.8 M guanidine-HCl, 100 mM 이상의 EDTA 및 5% 이상의 음이온 계면활성제

를 포함하고 있으며, COVID-19 진단 사용에 적합하지 않음

- 현재 COVID-19 분자진단은 virus 검체의 파쇄 후 즉시 RT-qPCR 진행으로 구성되며, 이를 위해 단백질변성제-free kit 또는 virus를 물리적으로 파쇄하는 기기를 활용하고 있음



제 7 장 참고문헌

- Benlurvankar V, Jebapriya GR, Gnanadoss JJ (2015) Protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 under solid state fermentation using groundnut oilcake as substrate. *Life* **50**:1-12.
- Bjerre J, Simonsen O, Vind J (2013) Detergent enzymes - from discovery to production. *Household and Personal Care Today* **8**:37-42.
- Chanalia P, Gandhi D, Jodha D, Singh J (2011) Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Rev. Med. Microbiol.* **22**:96-101.
- Charles P, Devanathan V, Anbu P, Ponnuswamy MN, Kalaichelvan PT, Hur BK (2008) Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J. Basic Microbiol.* **48**:347-352.
- Choi JH, Keum KC, Lee SY (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* **61**:876-885.
- Cowieson AJ, Roos FF (2016) Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* **221**:331-340.
- Cupia D, Thorsena M, Elvig-Jørgensena SG, Wulf-Andersena L, Berti-Sorbarab JO, Cowiesonb AJ, Faruk MU (2022) Efficacy and safety profile of a subtilisin protease produced by fermentation in *Bacillus licheniformis* to be used as a feed additive. *Heliyon* **8** <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10030>.
- Datar RV, Cartwright T, Rosen CG (1994) Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Nat. Biotechnol.* **11**:349-357.
- Ebeling W, Henrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem.* **47**:91-97.
- Eggenreich B, Wurm DJ, Rajamanickam V, Klausser R, Slouka C, Spadiut O (2020) High pressure homogenization is a key unit operation in inclusion body processing. *J. Biotechnol.* **324** <http://doi.org/10.1016/j.btecx.2020.100022>.
- Eiteman MA, Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.* **24**:530-537.
- Ellaiah P, Srinivasulu B, Adinarayana K (2002) A review on microbial alkaline proteases. *J. Sci. Ind. Res.* **61**:690-704.

- Esbin MN, Whitney ON, Chong S, Maurer A, Darzacq X, Tjian R (2020) Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA* **26**:771-783.
- Fazilat A (2016) Production, isolation, purification and partial characterization of an extracellular acid protease from *Aspergillus niger*. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* **3**:32-38.
- Khan F (2013) New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innov. Res. Chem.* **1**:1-6.
- Kumar CG, Takagi H (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* **17**:561-594.
- Kumar P, Sharma SM (2016) Enzymes in green chemistry: the need for environment and sustainability. *Int. J. Adv. Res. Publ.* **2**:337-341.
- Han SJ, Park H, Kim S, Kim D, Park HJ, Yim JH (2016) Enhanced production of protease by *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717 via statistical optimization of mineral components and fed-batch fermentation. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **46**:328-335.
- Jeong KJ, Lee SY (1999) High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3027-3032.
- Jeong SY, Choi JH, Kim EK, Kim SM, Son HJ, Cho NH, Choi JY, Park ES, Park JH, Lee JY, Choi SI, Woo JH, Kim OS (2014) Actual disinfection and sterilization control in Korean healthcare facilities. *J. Korean Acad. Fundam. Nurs.* **21**:392-402.
- Larsen AN, Moe E, Helland R, Gjellesvik DR, Willassen NP (2006) Characterization of a recombinantly expressed proteinase K-like enzyme from a psychrotrophic *Serratia* sp. *FEBS* **273**:47-60.
- Maitig AMA, Alhoot MA, Tiwari K (2018) Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *J. Pure Appl. Microbiol.* **12**:2059-2067.
- Muhammad N (2011) Biotechnological production of alkaline protease for industrial use. University of the Punjab, Lahore.
- Munawar TM, Aruna K, Swamy A (2014) Production, purification and characterization of alkaline protease from agro industrial wastes by using *Aspergillus terreus* (AB661667) under solid state fermentation. *Int. J. Adv. Res. Eng. Appl. Sci.* **3**:12-23.
- Muthulakshmi C, Gomathi D, Kumar DG, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Uma C (2011) Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under

- solid state fermentation. *Jordan J. Biol. Sci.* **4**:137-148.
- Naveed M, Nadeem F, Mehmood T, Bila M, Anwar Z, Amjad F (2021) Protease - A versatile and ecofriendly biocatalyst with multi industrial applications: An updated review. *Catal. Lett* **151**:307-323.
- Nigam PS (2013) Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules* **3**:597-611.
- Novelli PK, Barros MM, Fleuri LF (2016) Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem.* **198**:119-124.
- Oyeleke S, Egwim EC, Auta S (2010) Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *J. Microbiol. Antimicrob.* **2**:83-87.
- Page M, Di Cera E (2008) Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol. Life Sci.* **65**:1220-1236.
- Park HJ, Lee CW, Kim D, Do H, Han SJ, Kim JE, Koo BH, Lee JH, Yim JH (2018a) Crystal structure of a cold-active protease (Pro21717) from the psychrophilic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717, at 1.4 Å resolution: structural adaptations to cold and functional analysis of a laundry detergent enzyme. *PLOS One* online.
- Park HJ, Han SJ, Yim JH, Kim D (2018b) Characterization of an Antarctic alkaline protease, a cold-active enzyme for laundry detergents. *Korean J. Microbiol.* **54**:60-68.
- Ramanan RN, Tey BT, Ling TC, Ariff AB (2009) Classification of pressure range based on the characterization of *Escherichia coli* cell disruption in high pressure homogenizer. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **5**:21-29.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:597-635.
- Rekik H, Jaouadi NZ, Gargouri F, Bejar W, Frikha F, Jmal N, Bejar S, Jaouadi B (2019) Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *Int. J. Biol. Macromol.* **121**:1227-1239.
- Romsomsa N, Chim-anagae P, Jangchud A (2010) Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Sci. Asia* **36**:118-124.
- Roy I, Gupta MN (2004) Freeze-drying of protein: some emerging concerns *Biotechnol.*

Appl. Biochem. **39**:165–177.

Santos Aguilar D, Sato JG, Sato HH (2018) Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res. Int.* **103**:253–262.

Sawant R, Nagendran S (2014) Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**:568–579.

Sharma M, Gat Y, Arya S, Kumar V, Panghal A, Kumar A (2019) A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Indus. Biotech.* **15**:69–78.

Sharma N (2019) A review on fungal alkaline protease. *J. Emerg. Tech. Innov. Res.* **6**:1–14.

Siezen RJ, Leunissen JAM (1997) Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* **6**:501–523.

Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK (2015) Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Factories* **14**: DOI 10.1186/s12934-015-0222-8.

Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:303–310.

Siroya H, Patel S, Upadhyay D (2020) Industrial applications of protease: a review. *Stud Indian Place Names* **40**:224–232.

Souza PM, Bittencourt MLDA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RP, Silveira D, Fonseca YM, Ferreira EX, Pessoa A, Magalhães PO (2015) A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* **46**:337–346.

Thakur N, Goyal M, Sharma S, Kumar D (2018) Proteases: industrial applications and approaches used in strain improvement. *Biol. Forum J.* **10**:158–167.

Velooralappil NJ, Robinson BS, Selvanesan P, Sasidharan S, Kizhkkepawothail U, Sreedharan S, Prakasan P, Moolakkariyil SJ, Salias B (2013) Versatility of microbial proteases. *Adv. Enzyme Res.* **1**:1–13.

Wahab WAA, Ahmed SA (2017) Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA. *Int. J. Biol. Macromol.* **115**:447–458.

Watson RR (1976) Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. *Methods Microbiol.* **9**:1–14.



주 의

1. 이 보고서는 극지연구소에서 수행한 정책연구사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 정책연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.