

특집 : 새로운 감미료의 산업적 이용과 전망

내열성 전분당 전환효소 : 이성화효소 및 트레할로스 합성효소

고석훈, 박병철, 이대실[†]

한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소, 분자당생물학 Research Unit

내열성 미생물, *Thermus caldophilus* GK24에 대한 탄수화물 생합성을 연구하는 과정에서 다양한 탄수화물 관련효소를 탐색하고 그에 대한 생화학적 및 분자생물학적 연구를 수행하고 있다. 일차로 내열성 미생물내 1) 당핵산염 합성효소와 당전이효소, 2) 탄수화물 대사효소, 3) 탄수화물 분해 및 전환효소의 존재를 HPLC/Bio-LC분석을 통하여 확인하고, 이들에 대한 연구를 진행하고 있다. 본 연구발표에서는 포도당을 과당으로 전환하는 이성화효소(xylose isomerase), 그리고 맥아당을 트레할로스로 전환하는 트레할로스 합성효소(trehalose synthase)를 소개하고자 한다.

이성화효소는 이미 산업적 과당생산에서 대규모적으로 사용되고 있는 식품산업효소이다. 본 연구에서는 *Thermus caldophilus* GK24, *Thermus thermophilus* HB8, *Thermus flavus* AT62 3종의 내열성 미생물에 대한 이성화효소 유전자를 클로닝하고, 각 재조합 이성화효소를 대량생산하였다. 이 내열성 이성화효소는 최적 반응온도가 80°C이고, 포도당을 과당으로 전환하는 수율은 55%이었다. 이러한 과당전환율은 이미 산업적으로 사용되고 있는 이성화효소의 과당전환률(43%) 보다 훨씬 높은 것으로 과당생산공정의 단순화와 생산성 향상에 결정적인 요인이라 할 수 있다. 한편 본 이성화효소의 산업적 특성을 증대하기 위하여 구조-기능관계 연구를 착수하였다. 우선 내열성 이성화효소의 입체구조를 결정하였고, 구조조정에 따른 기능적 특성을 조사하기 위하여 특정위치의 선택적 변이연구를 진행하고 있다.

끝으로 포도당 전이효소를 추적하던 과정에서 맥아당을 트레할로스로 전환하는 새로운 효소를 *Thermus caldophilus* GK24에서 발견하였다. 그 트레할로스 합성효소는 분자량이 약 110 kDa이고 최적 반응온도가 75°C이며, 조효소없이 맥아당을 트레할로스로 80% 이상 전환해주는 가역 효소이었다. 본 연구에서는 효소반응의 조건과 특성을 조사하였고, 효소 아미노-말단의 서열결정정보를 통하여 효소의 유전자를 클로닝하고 그 유전자의 구조와 발현연

구를 진행하고 있다.

서 론

탄수화물 제제는 식품산업에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 생물소재이다. 그 중에서 설탕 등 일부 당류는 사탕수수나 같은 농산물 등에서 직접 추출하여 생산하고 있으나, 포도당과 과당 등 많은 식품소재는 전분을 가수분해하거나 또는 효소공학적인 전환방법으로 생산되고 있다. 이때 사용되는 효소는 대부분 미생물에서 유래하는 효소를 사용하고 있다. 새로운 기능성 탄수화물 소재의 추적이나 산업적인 생산기술의 개발측면에서 탄수화물소재를 다양하게 전환하여 주는 효소의 탐색과 확보는 매우 중요한 일이다. 본 연구실에서는 내열성 미생물, *Thermus caldophilus* GK24에 관한 탄수화물의 생합성을 연구하는 과정에서 다양한 탄수화물 관련 합성효소 및 전환효소를 추적하고 있다. 그 중에서 포도당을 과당으로 전환하는 이성화효소(glucose isomerase)와 맥아당을 트레할로스로 전환하는 트레할로스 합성효소(trehalose synthase)를 생화학적인 특성과 분자생물학적인 연구조사를 수행하여 온 연구결과를 본 연구발표에서 소개하고자 한다.

이성화효소

전분의 일차적인 가수분해 산물은 포도당과 맥아당이다. 특히 포도당은 발효산업과 같은 생물산업의 출발물질이자 식품소재 및 산업소재로서 다양하게 활용되고 있다. 그 중에서 가장 집중적으로 활용되는 것이 포도당으로 식품산업의 과당생산에 활용되고 있다. 과당은 식품 및 제과류에서 포괄적으로 사용되고 있는 식품소재로서 세계시장은 년 약 10조원에 달하고 있는 것으로 추정되고 있다. 이성화효소는 포도당을 과당으로 전환해주는 생체촉매이다. 현재 산업적 과당생산에서는 미생물유래 이성화효소를 사용하고 있다. 현재 산업현장에서 사용되고 있는 이성화효소

[†]Corresponding author

는 포도당에서 과당전환률이 43%로서 고과당 내지는 순수한 과당생산에 많은 제한점을 안겨주고 있다. 이러한 제한점을 극복하는 한 방법으로 내열성 이성화효소의 사용이다. 즉 포도당에서 과당으로 전환하는 이성화효소 반응의 온도를 높여 주므로써 반응의 평형을 과당쪽으로 옮겨주는 일이다. 이러한 측면에서 고온에서 작용하는 내열성 이성화효소는 매우 중요하게 부각되고 있다. 본 연구실에서는 화산지대의 고온천에서 서식하는 내열성 미생물 *Thermus caldophilus* GK24, *Thermus thermophilus* HB8, *Thermus flavus* AT62에서 부터 3종 이성화효소의 유전자를 대장균에 클로닝하고, 발현하여 재조합 이성화효소를 다량 생산할 수 있었다. 이 내열성 이성화효소는 공통적으로 아미노산 387개로 구성되어 있고, 분자량이 45 kDa이었다. 이성화효소 반응의 공통적인 최적 조건은 pH 7.0과 80°C에서 금속이온(Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+}) 존재 하에서 반응을 진행할 때이었다. 이 내열성 이성화효소의 과당전환률을 조사하였다. 그림 1에서 볼 수 있듯이 내열성 이성화효소는 포도당에서 과당전환률을 55%로 향상시키는 것을 알 수 있었다. 이는 일차상품인 고과당시럽과 같은 과당함유비율로서 산업현장에서 2단계 생산공정으로 제조하던 고과당시럽을 1단계 생산공정으로 간소화 할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 결과적으로 *Thermus*속 미생물에서 유래한 3종의 내열성 이성화효소는 유사한 생화학 및 분자생물학적인 특성을 갖고 있었고, 이 재조합 이성화효소는 전분당 산업에서 유용하게 사용될 수 있는 특징을 발견하였다.

더 나아가 산업공정 조건에서 요구되는 새로운 변이 이성화효소를 설계하고 제조하기 위하여 *Thermus caldophilus* GK24, *Thermus flavus* AT62의 재조합 이성화효소의 3차 구조를 X선 결정학기술을 이용하여 결정하였다.

트레할로스 합성효소

트레할로스(1 α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside)는 생물이 외부 환경변화에 대처하기 위하여 만드는 생체보존기능물질이다. 특히 고온에 서식하는 초고온 내열성 미생물이나, 저온환경에서 냉해를 막기 위하여 식물이나 미생물들이 필수적으로 생성하는 비환원성 이당류이다. 그래서 트레할로스는 곰팡이, 조류, 효모, 곤충, 미생물 등에서 발견되고 있다. 이러한 트레할로스의 특성은 오래전부터 생체분자의 안정제, 식품의 장기보존제 및 생물체제의 품질개선제로서 인식되어 왔고, 식품산업, 의약산업 및 생물 소재에서 매우 중요하게 사용될 수 있는 탄수화물 제제이다. 한편 트레할로스의 물성은 다른 당류와 비교하여 상대적으로 소수성이고, 대칭적인 구조를 가진 결정형 천연화합물이다. 일반적으로 생체는 포도당으로 부터 2단계 이상의 효소반응을 통하여 트레할로스를 생합성하고 있다. 이러한 복잡한 생합성 단계는 트레할로스의 산업화에 결정적인 제한점으로 되어 왔다. 그러한 관계로 트레할로스를 산업규모의 대량 생산기술이 지연되어 왔고, 효모 등에서 일부 추출하는 수준에 머물러왔다.

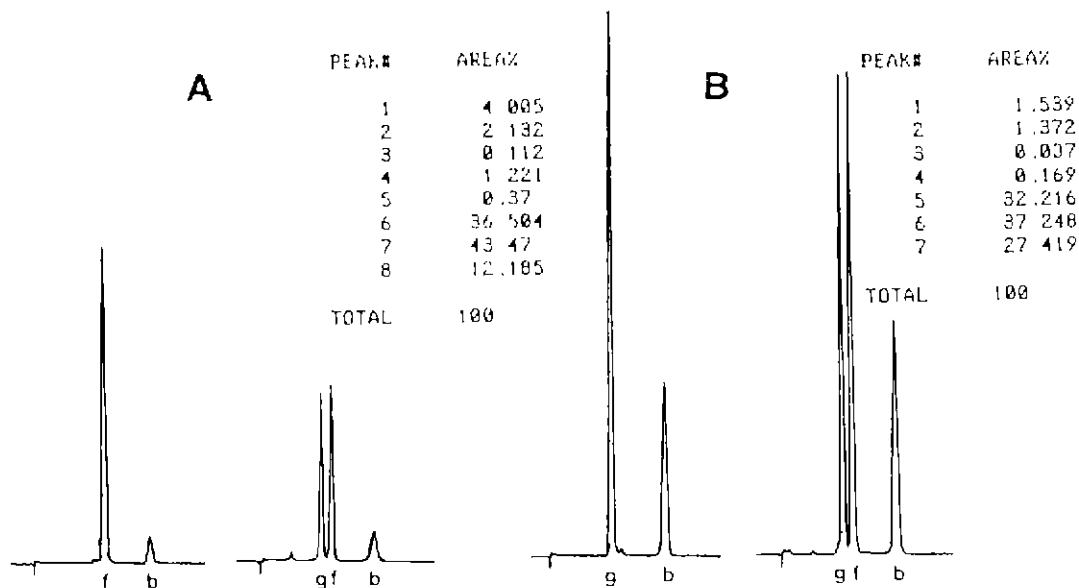


그림 1. 내열성 이성화효소에 의한 포도당-과당전환 결과의 크로마토그래프.

A는 이성화효소의 반응기질을 과당으로 하여 반응한 결과이고, B는 포도당을 기질로하여 생성된 반응산물의 크로마토그래프; 분석은 pulsed-amperometric detector가 부착된 HPAEC(Dionex)에 의해 수행하였음, 그림내 g는 포도당, f는 과당을 그리고 b는 HEPES 완충요액을 나타낸다.

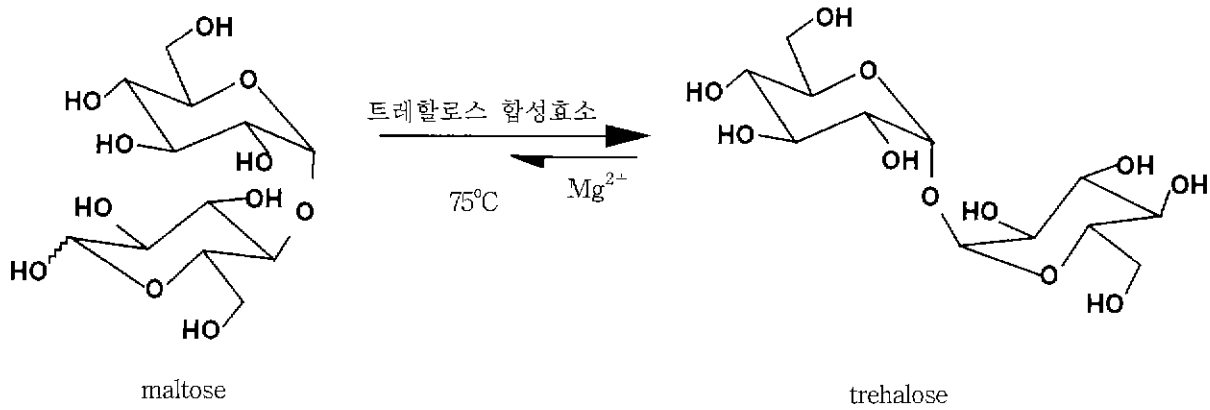


그림 2. 트레할로스 합성효소에 의한 맥아당-트레할로스 전환반응.

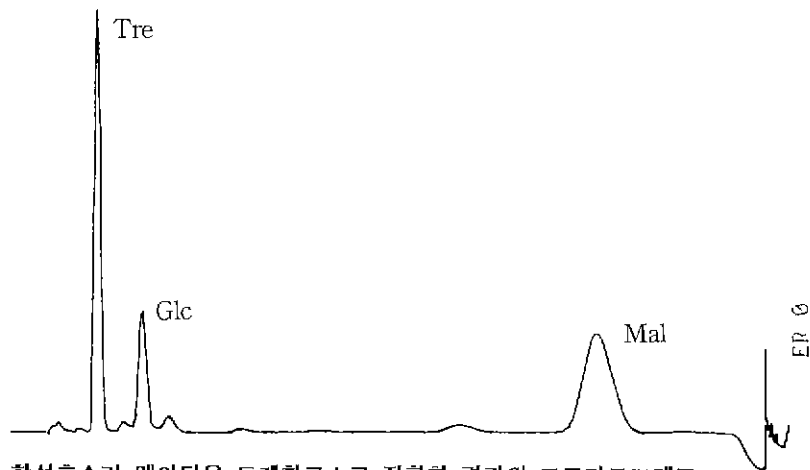


그림 3. 트레할로스 합성효소가 맥아당을 트레할로스로 전환한 결과의 크로마토그래프.

주산물은 트레할로스이고, 적은 양의 포도당이 동시에 산출됨, 분석은 pulsed-amperometric detector가 부착된 HPAEC (Dionex)에 의해 수행하였음.

본 연구실에서는 내열성 미생물, *Thermus caldophilus* GK24에 대한 탄수화물 생합성에 관여하는 포도당 전이효소를 추적하던 과정에서 맥아당을 이용하여 트레할로스로 전환하는 트레할로스 합성효소를 확인하고, 이들에 대한 후속 연구를 진행하여 왔다. 이 트레할로스 합성효소는 분자량이 약 110 kDa이고 최적 반응온도가 75°C이며, 조효소 없이 맥아당을 트레할로스로 80% 이상 전환해 주는 가역효소이었다(그림 2, 3). 이러한 효소반응의 특성은 트레할로스의 산업적 생산에 적합한 효소임을 알 수 있었다. 한편 이 트레할로스 합성효소를 다량 확보하기 위하여 분자생물학적인 연구를 병행하여 추진하고 있다. 우선 효소 아미노-말단의 서열결정정보를 통하여 효소의 유전자를 클로닝하였고, 그 유전자의 구조와 발현연구를 진행하고 있다.

결 론

내열성 미생물은 고온환경에 적응하기 위하여 독특한 생체반응과 효소반응 조건을 갖고 있다. 이러한 효소반응의 특성은 산업적인 조건에 잘 적응하고 생산공정의 단순

화나 생산성 증대에 바로 적용할 수 있는 특징이 있다. 특히 내열성 이성화효소를 이용한 과당생산은 단순 생산공정과 과당전환 수율 증대로 산업현장에서 바로 활용할 수 있으리라 본다. 한편 다양한 기능을 갖고있는 트레할로스는 내열성 트레할로스 합성효소를 이용하여 새로운 생산기술을 정립할 수 있다고 본다. 마지막으로 내열성 미생물에는 다양한 탄수화물의 전이, 전환 및 대사반응이 추가적으로 존재할 것으로 보고 있으며 새로운 내열성 탄수화물 관련효소의 추적과 공전개발연구는 식품산업 뿐 아니라 생물산업의 핵심적인 연구대상이라 할 수 있다.

문 헌

1. Park, B. C., Koh, A. K., Chang, C. S., Suh, S. W., Lee, D-S. and Byun, S. M. : Cloning and expression of the gene for xylose isomerase from *Thermus flavus* AT62 in *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **62**, 15-27(1997)
2. Park, B. C., Kim, J. S., Lee, D-S. and Byun, S. M. : One-Strand PCR : A comparably efficient method for chromosomal walking. *Bio. Techniques*, **21**, 592-594(1996)