

초호열균(Hyperthermophile)과 초호열성효소(Hyperthermophilic enzyme) 및 이의 응용

김 병 찬

연세대학교 생물산업소재연구센터

미생물은 생육온도에 따라 저온균, 중온균, 고온균으로 나뉘어진다. 특히 고온균을 다시 세분하여 고온균(moderate thermophile), 고도호열균(extreme thermophile), 초호열균(hyperthermophile)으로 나누기도 한다. 여기서 고도호열균이란 생육온도가 65~85°C인 균주를, 초호열균이란 생육온도가 85~110°C인 균주를 말하는 것으로, 일부 초호열균의 경우 80°C 이하의 온도에서는 생육이 일어나지 않으며, 최적생육온도가 물의 끓는점인 100°C 이상인 경우도 보고되고 있다[1, 2]. 그러나 1960년대까지만 해도 고도호열균 및 초호열균의 존재를 아무도 예상하지 못했으며, 1963년 Kemper는 science에 생명유지가 가능한 온도는 73°C라 선언하였다[3]. 그러나, 불과 10년도 지나지 않아 Brock와 Freeze에 의해 최초로 고도호열균인 *Thermus aquaticus*가 발견되었으며[4], 현재 분자생물학에서 없어서는 안될 가장 중요한 효소가 되어버린 Taq DNA polymerase는 바로 이 고도호열균에서 유래한 것이다. Brock와 Freeze에 의해 최초로 고도호열균이 분리된 이후 지난 30년간 많은 연구자들에 의해 매우 다양한 고도호열균 및 초호열균이 발견되고 분리 동정되었다. 현재까지 가장 높은 생육온도를 지닌 초호열균은 *Pyrolobus fumarii*(Fig. 1)로 최적생육

온도는 106°C, 최대 113°C에서도 생육이 일어나는 것으로 보고하고 있으며[5], 113°C가 현재까지 생명체의 생육이 일어나는 최고의 극한온도로 여겨지고 있다. 16S rDNA에 의한 분자생물학적 분류학이 발달하면서, 초호열균은 진핵생물(Eukaryote)에도 원핵생물(Prokaryote)에도 속하지 않는 새로운 세 번째 생명체계인 원시생물(Archaea)로 분류, 체계화되었다. 원시생물은 형태학적으로는 원핵생물과 유사하나 분자생물학적으로는 오히려 진핵생물에 가깝다는 것이 밝혀졌으며, 16S rDNA sequence에 의한 생명진화도를 보면 이들 원시생물은 원핵생물의 줄기가 아닌 진핵생물의 줄기를 따라 분리되어 있음을 확인할 수 있다(Fig. 2). 원시생물에 속하는 초호열균을 비롯한 극한환경미생물은 생명의 한계와 기원, 그리고 생명의 다양성과 같은 근본적인 문제에 대한 우리의 지식과 이해를 넓혀 주었으며, 지금까지 알려져 있는 원핵생물과 진핵생물과는 전혀 다른 생물자원의 보고가 될 가능성을 가지고 있다. 특히, 초호열균에서 유래된 효소는 내열성과 유기용매에 대한 안정성이 매우 우수하여 식품공학, 생물공학 및 화학공학



Fig. 1. Electron micrographs of ultrathin sections of *Pyrolobus fumarii*. Bar, 200nm.

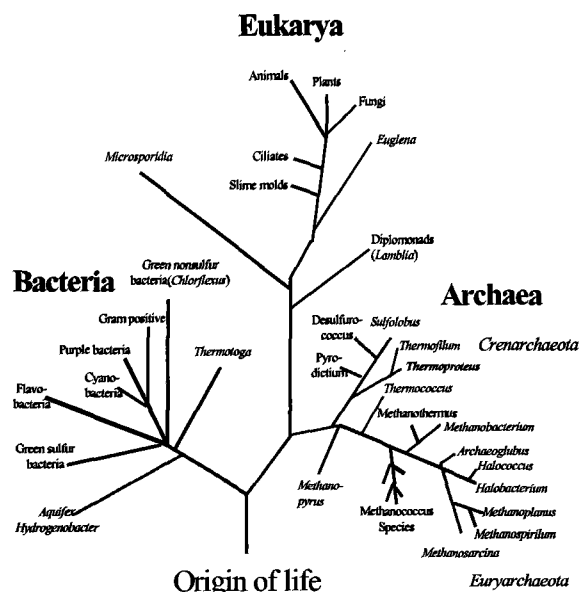


Fig. 2. Phylogenetic tree of life.

적으로 그 응용범위가 매우 광대할 것으로 기대된다.

초호열성효소의 특성과 생명공학적인 장점

초호열성효소의 가장 큰 특징은 80°C 이상의 높은 온도에서 매우 우수한 내열성과 최적활성을 나타낸다는 것이다. 이러한 초호열성효소는 대부분 초호열균으로부터 생산되는 것들이며, 대체로 미생물의 생육온도와 그 미생물이 생산하는 효소의 최적활성온도는 일치하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 생체고분자 분해효소인 protease 및 탄수화물 분해효소와 같은 세포외효소의 경우, 균주의 생육온도보다 높은 온도에서 최적활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, *Thermococcus litoralis*가 생산하는 세포외 효소인 amylopullulanase는 균주의 생육온도보다 무려 29°C 높은 117°C에서 최적효소활성을 나타낸다[6]. 일부 세포내 초호열성효소의 경우에는 기질, 조효소, 염등과 같은 효소안정제에 의해 효소가 내열성을 확보하는 것으로 여겨지고 있다[7]. 초호열성효소는 그 본래의 내열성으로 인해 중온성효소에 비해 생명공학적으로 몇가지 중요한 장점을 지닌다. 첫째, 초호열성효소가 중온균에서 발현될 경우 중온균 유래의 효소는 열에 쉽게 변성되므로, 80°C 이상의 고온에서 열처리를 함으로써 원하는 초호열성효소만을 정제하는 것이 매우 용이하다. 이러한 장점은 초호열성효소의 연구를 촉진하는 중요한 촉매제가 되었다. 두 번째로, 초호열성효소의 경우 내열성 외에 다른 유기용매 및 염 등과 같은 단백질 변성체에도 강한 내성을 지닌다. 이와 같은 장점은 초호열성효소의 고온고압 내지 유기용매 내에서의 화학반응촉매로의 이용가능성을 제시한다. 마지막으로 고온에서 효소반응을 할 경우 기질의 농도를 높이고 점도는 낮출수 있으며, 다른 미생물에 의한 오염을 줄일 수 있다. 이와 같은 생명공학적, 산업적 장점은 학문적으로서 뿐만 아니라 산업적으로서의 초호열성효소의 연구를 촉진하여, 많은 유전자가 cloning되고 중온균내에서 발현되어 연구되어왔다.

초호열성효소에 내열성을 부여하는 기작

Hydrophobic force는 protein folding에 가장 중요한 요소로 여겨져 왔으며, 따라서 이 힘은 단백질에 안정성을 부여하는데도 중요한 역할을 할 것으로 추정되어 왔다[8]. 지금까지의 연구결과는 hydrophobicity가 정말 초호열성효소의 안정성을 부여하는 중요한 요인 중 하나임을 뒷받침해 주었다. 그러나 hydrophobicity만으로는 모든 초호열성효소의 안정성에 대해 설명하기가 불충분하며, 지난 20년간 축적되어온 초호열성효소의 아미노산 배열, mutagenesis, 단백질의 3차구조, thermodynamics에 의한 실험적 결과들은 초호열성효소에 안정성을 부여하는 중요한 기작이 하나가 아니라는 결론을 내리

고 있다[7]. 초호열성효소가 80°C 이상의 고온에서 안정하다고 하여 자연계에 존재하는 20개의 아미노산과는 전혀 다른 새로운 아미노산을 함유하고 있는 것도 아니며, 더욱 놀라운 사실은 초호열성효소와 중온성효소의 차이는 단지 효소가 활성을 나타내는 온도의 차이일 뿐이라는 것이다. 즉, 초호열성효소와 중온성효소는 그 상동성이 매우 높으며, 단지 몇몇 아미노산의 차이에 의해 효소에 내열성이 부여된다는 사실이 밝혀져 왔다[9, 10]. 또한, 초호열성효소와 중온성효소의 단백질 3차구조가 거의 일치하며, 이것은 초호열성효소와 중온성효소의 효소 작용기작이 서로 동일하다는 것을 의미한다. 결론적으로 각각의 효소마다 열안정성을 부여하는 중요한 요소는 서로 다르며, 또한 같은 초호열성효소라 하더라도 생산균주의 생육환경에 따라 효소에 열안정성을 부여하도록 각기 다른 전략에 따라 진화되었다는 것이다. 초호열성효소에 열안정성을 부여하는 몇가지 주요한 요소에 대해 간략히 소개하면 다음과 같다.

아미노산조성

초호열성단백질과 중온성단백질의 아미노산조성에 대한 비교를 하여보면 아직까지 중요한 차이가 발견되지는 않는다. 그러나 지금까지의 통계적인 분석에 의하면, 초호열성단백질일수록 Gly가 Ala로 Lys가 Arg으로 치환되는 경향이 있으며, alanine의 경우, helix를 형성하는데 가장 적절한 아미노산이기 때문이라는 추정을 하고 있다[11]. Xylose isomerase의 경우 Asn과 Gln의 양이 중온성효소에서 초호열성효소로 갈수록 줄어드는 경향을 보이고 있다. 이것은 Asn과 Gln이 고온에서 deamidation에 의해 쉽게 변성되기 때문인 것으로 추정한다[10]. 하지만 이것도 family II type의 xylose isomerase에만 적용되고, I type의 xylose isomerase에서는 이러한 관계가 적용되지 않는다.

Disulfide Bridges

*Aquifex pyrophilus*의 serine protease의 경우 8개의 cysteine 잔기를 가지고 있으며, 이 효소를 dithiothreitol로 처리하면 85°C에서 효소의 반감기가 90시간인 것이 2시간 이내로 줄어드는 것이 관찰되었다[12]. 이것은 disulfide bridge가 분명 초호열성효소에 내열성을 부여한다는 것을 의미한다. 100°C의 고온에서 disulfide bridge는 매우 불안정한 것으로 기존에 보고되었으나 이것은 중온균효소의 경우이고, 100°C 이상의 온도에서 최적활성을 보이는 초호열성효소내의 disulfide bridge의 경우는 100°C의 고온에서 안정한 것으로 나타났다. 이것은 disulfide bridge가 효소내에 있어 용매와의 직접적인 접촉을 피함으로써 가능한 것으로 설명하고 있다[13].

Hydrophobic interaction

Protein folding시에 methyl group이 단백질의 core내로 추

가로 더 들어갈 경우 효소의 hydrophobicity가 증가하고, 효소의 내열성이 증가하는 것으로 보고하고 있다[14].

Ion pair

초호열균인 *Pyrococcus furiosus*의 GDH와 *Clostridium symbiosum*의 GDH는 아미노산 상동성이 34%로 단백질 3차 구조가 거의 유사하다. 이 두 효소의 가장 큰 차이점은 ion pair의 양이 초호열성효소의 GDH가 *C. symbiosum*의 GDH보다 무려 2배가 높다는 것이다. *P. furiosus*의 GDH내 모든 Arg잔기의 90%가 ion pair에 참여하고 있다[15]. *P. furiosus*의 methyl aminopeptidase의 경우도 *E. coli*의 효소에 비해 많은 ion pair를 지니고 있으며, 낮은 pH와 높은 염농도에서 초호열성효소의 안정성이 감소하는 것으로 보고되었다. 이는 낮은 pH와 염이 단백질의 ion pair를 깨트린다는 기존의 결과와 일치하는 것으로 ion pair가 고온에서 이 효소의 안정성을 부여한다는 사실을 입증하는 것이다[16]. 하지만 앞서서도 언급했듯이 초호열성효소에 내열성을 부여하는 성질이 ion pair에 의해서만 설명될 수는 없으며, 이는 염에 의해 오히려 많은 초호열성효소들의 내열성이 증가된다는 사실과 상반되는 것이다.

Proline

단백질의 unfolding entropy를 감소시킴으로써, 단백질에 안정성을 부여할 수 있는 것으로 여겨지고 있으며[17], 적절한 아미노산을 site-directed mutagenesis에 의해 proline으로 치환함으로써 unfolding entropy를 감소시켜 단백질에 내열성을 부여하는 실험이 수행되어 왔다. 고온균인 *Thermoanaerobium brockii*의 alcohol dehydrogenase의 경우 중온균인 *Clostridium beijerinckii*의 효소보다 8개가 더 많은 proline 잔기를 지니고 있다[18]. 초호열균인 *Thermotoga neapolitana*의 xylose isomerase는 *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*의 효소에 비해 단백질 내 loop안에 2개의 proline을 지니고 있으며, *T. thermosulfurigenes*의 효소의 같은 위치에 아미노산을 proline으로 치환한 경우, 내열성이 상당히 증가한 것으로 보고하고 있다[19].

Metal

금속이온은 많은 금속관련 효소의 활성을 증가시키고 안정성을 부여하는 것으로 알려져 왔으며, 이는 초호열성효소에 있어서도 적용된다. Xylose isomerase의 경우, Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 의 금속이온이 필요한 것으로 보고되고 있으며, Mg^{2+} 은 glucose를 fructose로 이성화하는데, Mn^{2+} 은 xylose를 xylulose로 이성화하는데 필요한 금속이온이다. 앞의 두 금속이 이성화 활성의 activator로 작용하는데 반해 Co^{2+} 는 효소의 구조적 안정성에 기여하여 내열성을 부여하는 것으로 추정되고 있다[20, 21]. 이는 arabinose isomerase에 있어서 더 분명해지는데, 중온성유래의 arabinose isomerase의 경우 단지 효

생물산업

소활성의 activator로 Mn^{2+} 만이 영향을 주는 것으로 여겨지나 초호열균인 *Thermotoga neapolitana*의 경우 Mn^{2+} 외에 Co^{2+} 가 효소의 활성과 내열성에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다 [unpublished data]. 또한, 몇몇 초호열성효소의 경우 같은 중온성효소에는 가지고 있지 않은 metal binding site를 지니는 것으로 보고되었다. 예를 들어 *Sulfolobus* sp.의 ferredoxin은 중온성효소에서 발견되지 않는 zinc binding site가 존재하여 zinc 존재시 효소의 Tm값이 9°C나 증가하는 것으로 알려졌다 [22, 23]. 고온균인 *Thermoactinomyces vulgaris*의 subtilisin-type serine-prtease인 thermitase의 경우 중온성효소에서는 보이지 않는 세 개의 Ca^{2+} biniding site가 존재하는 것으로 보고되었다[24]. 고온성 *Bacillus* sp. Ak1에서 생산되는 thermitase와 유사한 protease의 경우에는 네 개의 Ca^{2+} binding site가 존재하여 thermitase보다 훨씬 더 높은 내열성을 나타내었다. *Bacillus* sp. Ak1의 protease의 경우 80°C에서 반감기가 15시간으로 보고되었는데 이는 thermitase의 19분에 비교할 때 훨씬 높은 내열성을 나타내는 것이다[25].

이 외에도 초호열성효소에 내열성을 부여하는 요소로 수소결합, aromatic interaction, intersubunit interaction, posttranslation modification 등의 여러 가지가 알려져 있다[7].

초호열성효소의 산업적 응용

전분가공산업에의 응용

전분가공은 크게 세 가지 공정으로 구성된다. 첫째, α -amylase에 의해 전분을 액화(liquefaction)하는 공정으로 pH 6.5, 100°C에서 Ca^{2+} 을 첨가하여 전분을 maltodextrin으로 가수분해한다. 두 번째 공정은 amyloglucosidase와 debranching 효소인 pullulanase에 의한 당화(saccharification)과정으로 pH 4.5, 60°C에서 maltodextrin을 전분당(glucose syrup)으로 가수분해한 후 최종적으로 glucose isomerase에 의해 pH 8, 60~65°C의 조건 하에서 glucose를 이성화하여 약 42%의 fructose solution을 제조한다(Fig. 3). 다음은 추가적인 정제공

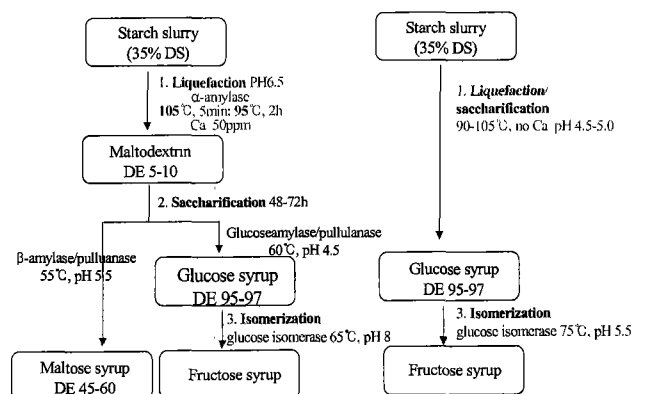


Fig. 3. Flow chart of fructose production process.

정을 거쳐 sucrose와 유사한 감미도를 가지도록 fructose 농도를 55%로 농축한 HFCS가 생산된다. 최근에 초호열균이 분리되면서 이들 균주로부터 분리된 초호열성, 내열성 α -amylase, amyloglucosidase 그리고 pullulanase를 이용하여 액화공정과 당화공정을 90°C 내지 105°C의 고온과 pH 4.5~5.0의 약산성의 조건에서 하나의 통합된 공정으로 진행하여 전분으로부터 전분당을 바로 생산하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 그리고 이성화공정도 기존의 공정과 다른 75°C, pH 5.5의 조건에서 진행하여 앞의 공정상의 고온 약산성 조건을 그대로 이용함으로써 HFCS생산비용을 상당히 절감할 수 있는 가능성이 있다. 일부 연구자들은 액화, 당화, 이성화의 세 공정을 모두 초호열성 효소를 이용하여 고온, 약산성의 반응조건에서 직접 전분으로부터 HFCS를 생산하고자 하는 시도도 연구하고 있다[26, 27]. 고온, 약산성의 동일조건에서 행하면 기존의 공정에서와 같이 각 공정에 따라 반응온도와 pH를 바꾸지 않아도 되므로 HFCS의 생산비용을 획기적으로 절감할 수 있을 것으로 기대된다. 초호열균은 대부분 고온 및 산성의 조건인 화산 활동과 관련된 지역에서 분리되므로 위와 같은 조건을 만족할 수 있는 새로운 효소를 분리할 가능성이 크다. 특히, 주목할 점은 현재 이성화공정의 반응온도인 55°C 내지 65°C에서 전분당을 이성화할 경우 fructose 함량이 42%인 HFCS가 생성되나, 이성화반응을 100°C에 가까운 고온에서 행할 경우, 그 전환율이 55%이상으로 높아지는 것으로 보고되고 있다[28]. 그러므로 55%의 fructose 함량을 지닌 HFCS를 생산하기 위한, 비용이 많이 드는 추가적인 정제공정을 생략할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 한가지 문제점은 기존의 반응조건인 pH 8의 알칼리 조건에서 이성화온도만을 100°C에 가까운 온도로 높일 경우 갈색화반응에 의한 부산물이 많이 생성되므로, 기존의 glucose isomerase와 달리 최적 반응 pH도 중성 내지 약산성인 glucose isomerase를 개발할 필요가 있다. Galactose로부터 tagatose를 생산하는데도 초호열성 arabinose isomerase를 이용할 경우, 중온성효소를 이용할 때 보다 매우 큰 장점을 지닌다. Tagatose는 당도가 설탕과 유사하나 생체내에서 대사가 일어나지 않는 비칼로리당으로 다른 대체감미료와는 달리 부작용이 거의 없고, 성상이 설탕과 매우 유사하여 완벽한 설탕 대체 저칼로리 감미료로 각광받을 것으로 기대된다[29]. *E. coli* 유래의 arabinose isomerase의 경우 galactose로부터 tagatose로의 전환율이 상온에서 30% 수준인 것으로 보고되고 있으나[30], 초호열성균인 *Thermotoga neapolitana*의 arabinose isomerase를 사용할 경우, 80°C에서 최고 65%의 전환율을 나타내었고 이성화활성속도 또한 중온성효소의 10배 이상인 것으로 여겨지고 있다[unpublished data].

분자생물학에의 이용

T. aquaticus 유래의 *Taq* DNA polymerase에 의한 PCR 기

술의 개발은 분자생물학에 있어 혁신적인 발달을 가져왔으며, 현재의 인간 genome의 모든 유전자가 밝혀진 것도 본 효소가 없었으면 불가능했을 것이라는 것은 자명한 일이다. 현재는 초호열성균주인 *Thermococcus litorlis* 유래의 Vent DNA polymerase와 이보다 더 높은 온도수준의 *Pyrococcus furiosus* 유래의 *Pfu* DNA polymerase가 개발되어 더 높은 내열성과 fidelity를 갖춘 효소가 개발되었고, 이는 site-directed mutagenesis를 비롯한 여러 생명공학기법의 발전을 가져왔다. 내열성 DNA ligase 역시 이미 상업적으로 얻을 수 있으며, 본 효소는 ligase chain reaction, mutational analysis, gene synthesis 등 새로운 생명공학기술에 응용되고 있다. 이외에도, 초호열성 protease, peptidase 및 alkaline phosphatase 등이 분자생물학에 응용되기 시작하였다.

Cellulose 분해와 ethanol 생산

Cellulose는 지구상에 가장 풍부한 탄소원 중 하나이다. 따라서 cellulase를 이용한 cellulose의 분해와 이를 통한 ethanol 발효를 하려는 시도가 오래전부터 연구되어 왔다. 그러나 이를 실현하지 못하는 가장 큰 이유는 cellulase의 활성이 낮아 cellulose를 산업적으로 이용하는데 경제적인 어려움이 크다는 것이다. Cellulose는 높은 온도에서 알칼리를 통한 전처리를 하여 분해시키므로, 초호열성 cellulase는 cellulose분해에 가장 적합한 효소로 여겨진다.

Paper pulp bleaching

종이를 생산하기 위한 pulping 공정은 wood fiber를 고온에서 알칼리처리하는 것이며, 잔존하는 lignin을 제거하기 위해 고온의 조건에서 chlorine을 처리함으로써 bleaching 공정을 행한다. 이때 많은 오염폐수가 발생하는 데 이는 hemicellulase를 처리함으로써 chlorine의 양을 줄이고 폐수의 양을 줄일 수 있게 된다. Pulping과 bleaching은 모두 고온에서 행해지므로 호열성이면서 내열성이 우수한 hemicellulase를 요구하게 된다.

Chemical synthesis

호열성효소인 thermolysin에 의해 dipeptide aspartame을 산업적으로 생산한다. 초호열성효소의 경우 내열성과 유기용매에 대한 안정성으로 인해 앞으로 화학합성에 이용될 수 있는 많은 가능성을 지니고 있다고 하겠다. 이외에도 제약 및 식품 산업에서의 immunoassay에의 이용과 pectin, chitin 등의 biopolymer의 분해, 동물사료의 생산 등 다양한 분야에 초호열성효소가 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

앞으로의 전망

지난 30년간 수많은 초호열성균주가 새로 발견되었으며, 지

금도 새로운 초호열성균주가 동정되고 보고되고 있다. 또한 동정된 초호열성균주로부터 수백의 유전자가 cloning되어 중온균에서 발현되고 그 특성이 조사되었다. 그러나 초호열균과 초호열성효소에 대한 연구가 처음의 기대를 충족시키지 못한 것은 사실이다. 화학반응에서는 온도가 10°C 증가할 때마다 반응속도가 2~3배 증가한다. 따라서 화학반응온도가 50°C 증가하게 되면 이론상 수십배에서 수백배의 반응속도의 증가를 가져오게 된다. 이와 같이, 처음 초호열성균과 초호열성효소를 연구한 연구자들은 초호열성효소가 중온성효소에 비해 최적효소반응온도가 수십도 증가함에 따라 효소반응속도도 최소 수십배 이상 증가하리라 기대하였다. 그러나 초호열성효소와 중온성효소의 활성정도는 각각의 최적활성온도에서 거의 유사한 것으로 드러났다. 즉, 초호열성효소가 최적활성온도는 높아도 그 온도에서의 활성정도는 중온성효소의 최적활성정도와 유사한 값을 나타내며, 단지 내열성이 증가하는 것으로 드러났다. 이로 인해 초호열성효소는 본래 효소가 갖는 장점을 갖지 못한다. 즉 대부분의 초호열성효소의 경우 상온에서는 활성을 나타내지 못하며, 이는 초호열성효소의 산업적 이용에의 가장 큰 제약이 되고 있다. 이와 같은 결과로 인해 효소의 견고성(rigidity)과 활성(activity)사이에서 마치 반비례관계가 성립하는 것으로 생각되었다. 즉, 초호열성효소의 경우 내열성이 증가함에 따라 효소의 견고성이 증가하고[31], 이로 인해 활성부위의 유연성(flexibility)이 감소하여 내열성은 증가하나 활성능은 감소하는 것으로 여겨진다. 그러나 directed evolution과 같은 강력한 효소개량기술이 발달하면서, 자연계에 존재하지 않는 효소, 즉, 활성과 내열성이 함께 증가하는 인공적 효소의 개발이 가능하다는 것이 증명되고 있다[31, 32]. 이는 초호열성효소의 경우, 충분히 효소개량기술에 의한 효소활성의 증가가 가능하다는 것을 의미한다. *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase의 경우 site-directed mutagenesis에 의해 효소의 최대활성을 2배 가량 증가시킨 것으로 보고하였다[19]. 이는 directed evolution에 의해 초호열성효소의 내열성은 그대로 유지하면서, 효소의 활성을 증가시킬수 있다는 한 예라 할 수 있겠다. 또한, 활성이 높은 중온성효소와 내열성이 우수한 초호열성효소의 유전자를 DNA shuffling에 의해 조합함으로써 활성과 내열성이 모두 우수한 새로운 효소의 개발 또한 가능할 것이다.

초호열성효소는 효소의 진화, 효소의 안정성과 활성 기작, 효소단백질의 3차구조와 효소기능간의 관계를 연구하는 중요한 자료를 제공해 줄 것으로 기대된다. 이는 앞으로 컴퓨터 모델링을 통해 미리 protein engineering을 통한 효소개량의 결과에 대한 예측을 가능하게 하게 할 것이며, 멀지 않은 미래에는 초호열성, 고효율효소의 개발을 가능하게 할 것이다. 현재 산업적으로 사용되고 있는 효소는 새로 개량된 초호열성효소에 의해 대부분 대체될 것이며, 새로운 화학반응의 촉매제로서

생물산업

초호열성효소의 응용은 무궁무한할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Leuschner, G. and G. Antranikian. 1995. Heat-stable enzyme from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 95-114.
2. Stetter, K. O. 1982. Ultrathin mycelia-forming organism from submarine volcanic areas having an optimum growth temperature of 105°C. *Nature.* **300**: 258-260.
3. Kemper, E. S. 1963. Upper temperature limit of life. *Science.* **142**: 1318-1319.
4. Brock, T. D. and H. Freeze. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**: 289-297.
5. Blöchl, E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch, and K. O. Stetter. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**: 14-21.
6. Brown, S. H. and R. M. Kelly. 1993. Characterization of amylolytic enzymes, having both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2614-2621.
7. Vielle, C. and G. J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanism for thermostability. *Microbiol. & Mol. Biol. Rev.* **65**: 1-43.
8. Dill, K. A. 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**: 7133-7155.
9. Davies, G. J., S. J. Gamblin, J. A. Littlechild and H. H. C. Watson. 1993. The structure of a thermally stable 3-phosphoglycerate kinase and a comparison with its mesophilic equivalent. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **15**: 283-289.
10. Vielle, C., D. S. Burdette and J. G. Zeikus. 1996. xylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1867-1875.
11. Argos, P., M. G. Rossmann, U. M. Grau, H. Zuber, G. Frank and J. D. Tratschin. 1979. Thermal stability and protein structure. *Biochemistry* **18**: 5698-5703.
12. Choi, I.-G., W.-G. Bang, S.-H. Kim and Y. G. Yu. 1999. Extremely thermostable serine-type protease from *Aquifex pyrophilus*. Molecular cloning, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **274**: 881-888.
13. Cacciapuoti, G., M. porcelli, C. Bertoldo, M. De Rosa and V. Zappia. 1994. Purification and characterization of extremely thermophilic and thermostable 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon

- Sulfolobus solfataricus*. Purine nucleoside phosphorylase activity and evidence for intersubunit disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **269**: 24762-24769.
14. Pace, C. N. 1992. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J. Mol. Biol.* **226**: 29-35.
15. Yip, K. S., T. J. Stillman, K. L. Britton, P. J. Artymiuk, P. J. Baker, S. E. Sedelnikova, P. C. Engel, A. Pasquo, R. Chiaraluce, V. Consalvi, R. Seandurra and D. W. Rice. 1995. The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* **3**: 1147-1158.
16. Ogasahara, K., E. A. Lapshina, M. Sakai, Y. Izu, S. Tsunasawa, I. Kato and K. Yutani. 1998. Electrostatic stabilization in methionine aminopeptidase from hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **37**: 5939-5946.
17. Matthews, B. W., H. Nicholson and W. J. Becktel. 1987. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 6663-6667.
18. Li, C., J. Heatwole, S. Soelaiman and M. Shoham. 1999. Crystal structure of a thermophilic alcohol dehydrogenase substrate complex suggests determinants of substrate specificity and thermostability. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **37**: 619-627.
19. Sriprapundh, D., C. Vielle and J. G. Zeikus. 2000. Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis by site-directed mutagenesis. *Protein Eng.* **13**: 259-265.
20. Marg, G. A. and D. S. Clark. 1990. Activation of the glucose isomerase by divalent cations: evidence for two distinct metal-binding sites. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 367-373.
21. Whitlow, M., A. J. Howard, B. C. Finzel, T. L. Poulos, E. Winborne and G. L. Gilliland. 1991. A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6Å *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Proteins.* **9**: 153-173.
22. Fujii, T., Y. Hata, M. Oozeki, H. Moriyama, T. Wakagi, N. Tanaka and T. Oshima. 1997. The crystal structure of zinc-containing ferredoxin from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus* sp. strain 7. *Biochemistry.* **36**: 1505-1513.
23. Kojoh, K., H. Matsuzawa and T. Wakagi. 1999. Zinc and an N-terminal extra stretch of the ferredoxin from a thermoacidophilic archaeon stabilize the molecule at high temperature. *Eur. J. Biochem.* **264**: 85-91.
24. Teplyakov, A. V., I. P. Kuranova, E. H. Harutyunyan, B. K. Vainshtein, C. Frommel, W. E. Höhne and K. S. Wilson. 1990. Crystal structure of thermitase at 1.4 resolution. *J. Mol. Biol.* **214**: 261-279.
25. Smith, C. A., H. S. Toogood, H. M. Baker, R. M. Daniel and E. N. Baker. 1999. Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of *Bacillus* Ak.1 protease at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **294**: 1027-1040.
26. Kaneko, T., S. Takahashi and K. Saito. 2000. Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces* sp., and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener(HFCS) production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 940-947.
27. Ge, Y., Y., H. Wang, H. Zhou, S. Wang, Y. Tong and W. Li. 1999. Coimmobilization of glucoamylase and glucose isomerase by molecular deposition technique for one-step conversion of dextrin to fructose. *J. Biotechnol.* **8**: 33-40.
28. Tewari, Y. B. and R. N. Goldberg. Thermodynamics of the conversion of aqueous glucose to fructose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **11**: 17-24.
29. Bertelsen, H., B. B. Jensen and B. Buemann. 1999. D-tagatose-a novel low-calorie bulk sweetener with prebiotic properties. *World Rev. Nutr. Diet.* **85**: 98-10929.
30. Roh, H.J., P. Kim, Y. C. Park and J. H. Choi. 2000. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**: 1-430.
31. Vihinen, M. 1987. Relationship of protein flexibility to thermostability. *Protein Eng.* **1**: 477-480.
32. Van den Burg, B., G. Briend, O. R. Veltman, G. Venema and V. G. Eijsink. 1998. Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12300-12305.
33. Zhao, H and F. H. Arnold. 1999. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng.* **12**: 47-53.