한국생물공학회지 제21권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 21, No. 4, 298-301(2006)

재조합 내열성 트레할로스 합성효소의 생산

[1]최 재 열 · [2]차 월 석 · [2]† 신 현 재
[1]한국생명공학연구원 바이오벤처센터 ㈜엔지뱅크, [2]조선대학교 생명화학공학과
(접수 : 2006. 5. 15., 게재승인 : 2006. 7. 22.)

Production of Recombinant Trehalose Synthase from *Thermus caldophilus* GK24

Jae Youl Choi[1], Wol-Suk Cha[2], and Hyun-Jae Shin[2]†
[1]EnzBank, Inc., 309 Bioventure Center (BVC), Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejon 305-333, Korea
[2]Department of Chemical and Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
(Received : 2006. 5. 15., Accepted : 2006. 7. 22.)

A gene (GeneBank AF 135796) coding for a trehalose synthase from *Thermus caldophilus* GK24 was cloned into *Escherichia coli* K12 using five vector systems. The constitutive expression system (pHCETS) which shows the highest trehalose synthase activity from flask culture of recombinant *E. coli* was selected for the production of trehalose from maltose. For the shake flask culture, the final dry cell weight was 0.9 g/L and the trehalose synthase activity was 25 U/mL. Fed-batch culture of recombinant *E. coli* harboring plasmid pHCETS which uses the glycerolas a carbon source was performed in jar fermentor: the dry cell weight of 20 g/L and the trehalose synthase activity of 13.7 U/mL were attained in 48 h.

Key Words : Trehalose, trehalose synthase, *Thermus caldophilus* GK24, constitutive expression vector, fed-batch culture

서 론

트레할로스 (D-glcopyranosyl-1,1-D-glucopyranoside)는 두 개의 포도당 결합으로 이루어진 세 종류 (α-α, α-β, β-β)의 이성질체를 가지는 비환원성 이당류이다(1, 2). 이것은 식물, 곤충, 곰팡이, 효모, 세균 등과 같은 다양한 생물체 내에서 존재하며, 에너지 보존과 탄소원의 역할 뿐만 아니라 여러 스트레스 요인들로부터 보호 기능을 한다(3-5). 또한 내열성, 내산성, 난흡습성, 단백질변성 방지 등의 특성으로 인해 식품, 의약품 산업에 꾸준히 사용 되어져 왔다(6). 트레할로스 합성효소를 생산하는 미생물로는 *Thermus caldophilus GK24*(7), *Thermus aquaticus* ATCC33923(8), *Pimelobacter* sp. R48(9), *Pseudomonas stutzeri* CJ38(10), *Grifola frondosa*(11) 등이 알려져 있다.

Thermus caldophilus GK24 유래의 트레할로스 합성효소 (trehalose synthase)의 유전자 (GeneBank AF 135796)는 2895 base pairs와 965 아미노산 잔기의 polypeptide로 암호화 되어 있으며, 그 분자량은 110 kDa이다. 이 효소의 유전자는 아밀라제 계열의 탄수화물 유전자와 높은 상동성을 가지며 *T. aquaticus* ATCC 33923와는 98.2%, *Pimelobacter* sp. R48과는 50.3%의 아미노산 상동상을 가진다(12). Trehalose synthase는 맥아당을 분자내 전이반응을 통해 트레할로스로 전환시키며 부산물로 포도당이 생성된다. *T. caldophilus* GK24유래의 trehalose synthase는 α-α-trehalose가 주산물이며 일부 α-β-trehalose (약 3%)가 생성되어진다(13). 또한 다른 중온균 유래와 달리 모 균주의 특성으로 인한 고온, pH, 변성제 등에 안정성을 가진다.

본 연구팀은 지난 보고에서 맥아당을 기질로써 *T. caldophilus* GK24유래의 trehalose synthase를 이용한 trehalose 생산 조건의 최적화를 제시하였다(14). 그러나 이때 사용한 효소는 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 유도물질로 사용하여 발현된 것으로 산업적 생산에는 무리가 있었다. 본 연구에서는 다양한 벡터시스템을 이용하여 식품용 효소생산용 숙주로서 적합한 *Escherichia coli* K12 내에서 trehalose synthase의 발현을 확인하였다. 또한 선별된 plasmid 시스템을 이용해 고가의 유도기질이 없이 제조 가

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-7518, Fax : +82-62-230-7226
E-mail : shinhj@chosun.ac.kr

능한 재조합 트레할로스 전환효소의 유가식 발효공정에 의한 트레할로스 생산의 기초자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용된 균주와 plasmids를 Table 1에 표시하였다. *E. coli* DH5α는 plasmid 제작을 위한 균주로 사용되었으며, 유전자 조작을 위한 배양은 Luria-Bertani 배지 (10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl)를 사용하였다.

배지 및 배양조건

발효조 접종용 균주의 배양은 200 ml CPGY배지 (50 g/l glycerol, 30 g/l peptone, 5 g/l yeast extract , 3 g/l KH_2PO_4, 7 g/l Na_2HPO_4, 3 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 5 g/l glutamic acid, 1 g/l $MgSO_4$, 1 g/l citric acid)를 사용하여 37℃에서 150 rpm으로 24시간 진탕배양 하였다. 회분배양 (batch fermentation)은 5 N HCl에 용해된 trace metal 용액 (10 g/l $FeSO_4$ $7H_2O$, 2 g/l CaCl2, 1.5 g/l MgSO47H2O, 1.5 g/l (NH4)2SO4, 2.2 g/l ZnSO47H2O, 0.5 g/l $MnSO_4$ $4H_2O$, 1 g/l $CuSO_4$ $5H_2O$, 0.1 g/l $(NH_4)_6Mo_7O_2$ $4H_2O$, 0.02 g/l $Na_2B_4O_7$ $10H_2O$)을 1 ml/l로 첨가한 CPGY 배지를 사용하였으며, 유가배양(fed-batch fermentation)을 위한 첨가 배지는 500 g/L glycerol, 200 g/L yeast extract, 1.5 g/l $MgSO_4$ $7H_2O$, 1.5 g/l $(NH_4)_2SO_4$를 사용하였다.

회분 및 유가배양은 5 l 발효조 (KoBiotech Co. Korea)를 사용하였으며, 발효조내 본배양 배지 2.3 l에 전배양 배지 0.2 l를 더하여 2.5 l의 working volume으로 가동하였다. 가동 조건은 37℃, 통기량 0.5 VVM이며, 용존산소는 교반속도를 변환시켜 최소 10%를 유지하였다. 배양 pH는 28% 암모니아수를 이용하여 6.8로 고정하였다.

단백질 정량

세포 파쇄후 부분 정제된 효소액의 단백질양은 BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc., USA)를 이용해 UV spectrophotometer (Ultraspec 3100pro: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.)로 수치화 하였다. 표준물질로는 kit 내 포함된 bovine serum albumin을 사용해 미리 구한 검량선으로부터 시료의 단백질 농도를 구하였다.

SDS-PAGE

배양액으로부터 회수된 세포를 micro tube에 0.1 g 모은 후, glass bead 0.2 g과 50 mM potassium phosphate buffer 500 ㎕를 첨가한 후 vortexing으로 세포를 파쇄하였다. Vortexing을 2분 수행 후, 얼음물에 1분 보관하는 과정을 3회 반복하였다. Vortexing 완료 후 micro tube를 70℃의 항온수조에서 20분 동안 열처리하여 변성된 단백질을 원심분리로 제거 후 그 상층액을 부분 정제된 효소 시료로 사용하였다. SDS-PAGE 분석은 12% acrylamide gel을 이용해 단백질 농도가 30 μg이 되도록 각각의 시료를 로딩하였으며, 전기영동 밴드는 Coomassie staining으로 확인하였다.

효소활성 측정

트레할로스 합성효소 (trehalose synthase)의 활성은 1% (w/v) 맥아당 1 ml을 기질로 10 ㎕ 효소 시료를 첨가하여 70℃에서 15분간 반응하고 100℃에서 10분간 끓여서 반응을 정지시킨 후 Bio-LC (Bio-liquid chromatography, Dionex CO., USA) 분석을 통해 확인하였고, 효소 1 U는 1분당 맥아당으로부터 전환되는 트레할로스 1.0 μmol 수로 정하였다.

분석방법

균체농도는 UV spectrophotometer (Ultraspec 3100pro: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.)를 사용하여 600 nm에서 흡광도와 건조균체량으로 결정하였고, 흡광도와 건조균체량의 표준곡선에 의해서 흡광도 (OD) 1.0에서 건조균체량은 0.363 g/L로 환산하였다. Glycerol 정량 및 효소활성측정은 CarboPacTM PA-1 분석용 컬럼 (Dionex, 250 × 4 mm)과 guard 컬럼 (Dionex, 50 × 4 mm)을 사용하여 25℃에서 electrochemical detector (ED40)와 함께 Bio-LC (Dionex) system으로 수행하였다. 이동상 용매는200 mM NaOH, 300 mM NaOAc + 100 mM NaOH, H_2O의 세가지 혼합용액으로 분당 0.3 ml 유속으로 전개하였다.

결과 및 고찰

Plasmids 제작

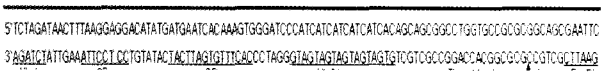
*Eco*RI과 *Sal*I의 양 말단을 가지는 trehalose synthase 유전자로 구축된 plasmid인 pTrcTS(14)를 이용하여, 동일 제한효소들로 절단된 plasmids를 ligation하여 pGEXTS, pKKTS, pHCETS를 구축하였다(Table 1). Zhang 등 (15)은 Shine-Dalgarno (SD) sequence와 downstream box (DB) sequence를 사용하여 *E. coli*에서 일부 재조합 단백질의 과발현을 보고하였다. 이것은 plasmid 상에서 목적하는 유전자의 N 말단쪽에 SD, DB, His6 tag로 연결된 oligonucleotide 단편을 위치시킨 것이다. Table 2는 본 연구에 사용된 99 bp로 구성된 SD, DB, His6 tag의 nucleotide sequence를 나타낸다. 합성제조된 oligonucleotide 단편은 *Xba*I과 *Eco*RI의 양 말단을 가지며, *Eco*RI과 *Sal*I의 말단을 가지는 trehalose synthase 유전자와 동시에 XbaI과 SalI으로 절단된 pKK223-3에 ligation하여 pKKHis6TS를 구축하였다(Table 1).

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Genotype or comments	Reference or source
Strain		
E. coli DH5α	F⁻ *(ø80d lacZΔM15)Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17(rk⁻ – mk⁺) recA1 endA1 relA1 deoR λ⁻*	INtRON[a]
E. coli K12 PR1031	F⁻ *thr::Tn10(Tet^R) dnaJ259 leu thuA2 lacZ90(oc) lacY glnV44 thi*	NEB[b]
Plasmids		
pTrc99a	Cloning vector derived from ColE1 with tac promoter , Ap^r	Pharmacia[c]
pKK223-3	expression vector derived from pBR322 with tac promoter, Ap^r	Pharmacia[c]
pHCE IIB	expression vector derived from pUC with HCE promoter, Ap^r	TaKaRa[d]
pKK223-His6	pKK223-3 containing SD, DB and His6 tag, Ap^r	This study
pGEX-4T-2	expression vector containing GST fusion protein,Ap^r	Pharmacia[c]

[a]INtRON Bio Inc., Sungnam, Kyungki-Do, Korea.
[b]New England Biolabs, Inc., Berverly, MA, USA.
[c]Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.
[d]TaKaRa Bio, Inc., Otsu, Shiga, Japan.

Table 2. Nucleotide sequence including SD sequence, DB sequence, His6 tag and thrombin cleavage site coding sequences for construction of plasmid pKK223-His6.



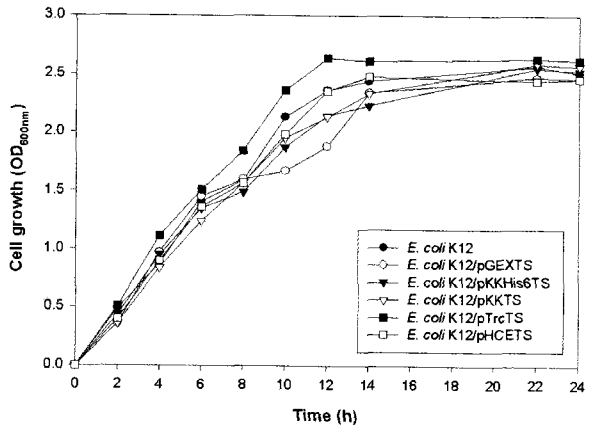


Figure 1. Typical cell growth profiles of recombinant *E. coli* K12 strains.

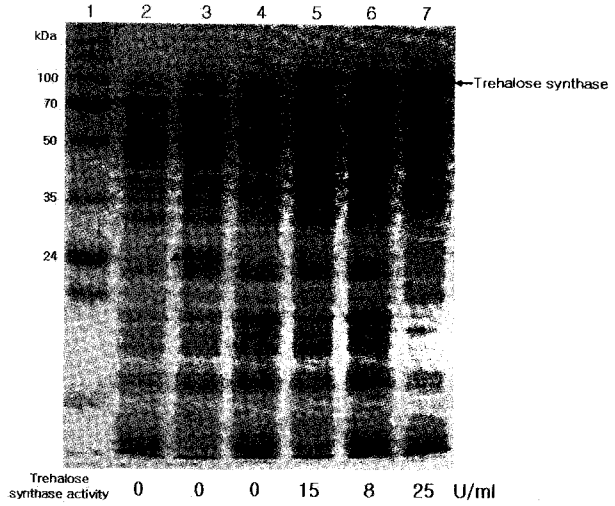


Figure 2. SDS-PAGE of recombinant trehalose synthase in *E. coli* harboring various plasmids. The lanes numbers are 1: size marker, 2: *E. coli* K12 host, 3: *E. coli* K12/pGEXTS, 4: *E. coli* K12/pKKHis6TS, 5: *E. coli* K12/pKKTS, 6: *E. coli* K12/pTrcTS, and 7: *E. coli* K12/pHCETS. A triangle of lane 3 indicate glutathione S-transferase (GST).

재조합 *E. coli*로부터 Trehalose synthase의 발현

Fig. 1은 shaking flask 배양에서 재조합 plasmid가 삽입된 *E. coli*의 성장곡선을 나타낸 것이다. 세포의 성장은 24시간 내에서 완료하였으며, plasmid가 형질전환 되지 않는 표준 균주와 5 종류의 plasmid가 형질전환된 각각의 *E. coli*와 유의적 차이를 보이지 않았다. 유도물질의 첨가가 필요 없는 high-level constitute expression system (HCE) promoter를 사용하는 항시적 발현 시스템(18)인 pHCETS를 제외한 나머지 유도 시스템을 사용하는 plasmid가 형질전환된 *E. coli*에서는 세포성장이 600 nm에서 흡광도가 0.7 내지 0.9에 도달하였을 때 배지 내에 유도물질인 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종 1 mM 농도로 첨가하였다. 서로 다른 시스템의 plasmid가 형질전환된 *E. coli*의 24시간 배양한 샘플을 회수하여 SDS-PAGE와 효소활성을 비교하였다. 동일 단백질 농도로 로딩한 SDS-PAGE에서 pKKTS, pTrcTS, pHCETS만이 trehalose synthase 밴드(약 110 kDa)가 확인되었다. 용해도 증가와 분리, 정제의 용이성을 위한 fusion partner가 결합된 pKKHis6TS와 pGEXTS에서는 trehalose synthase 밴드가 보이지 않았다. 그러나, pGEXTS에서는 fusion 단백질인 glutathione S-transferase (GST)의 밴드 (26 kDa)가 확인되었다. 효소활성은 trehalose synthase 밴드 두께와 비례적으로 pHCETS 시스템에서 가장 높은 효소 활성 (25 U/ml)을 나타내었다. 그러나, pKKHis6TS와 pGEXTS에서는 효소 활성이 확인되지 않았다. 이는 안정성, 소수성 등의 목적 단백질 자체의 특성으로 인한 fusion 시스템에서의 단백질 발현의 어려움이 보고된 바(16-17)와 같이 trehalose synthase 또한 높은 GC 함량, 큰 분자량 등의 구조적인 문제로 기인한다고 유추되며, 추후에 이 문제의 해결을 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

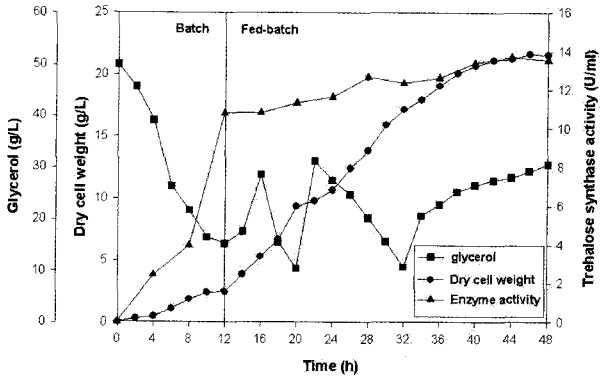


Figure 3. Time course profiles of glycerol, cell growth, and trehalose synthase activity during the batch and fed batch culture of recombinant *E. coli* K12/pHCETS.

Trehalose synthase의 회분 및 유가배양

Trehalose synthase의 효율적인 대량생산을 위해 flask culture에서 가장 좋은 활성을 보인 항시적 발현 시스템을 사용하는 재조합 *E. coli* K12/pHCETS를 이용하여 유가배양을 시도하였다. pHCE 시스템에서의 높은 생산성을 위하여 Poo 등(18)에서와 동일하게 trehalose synthase의 생산을 위한 탄소원으로 glycerol을 사용하였다. 전배양 배지에서 충분히 배양된 *E. coli*K12/pHCETS를 발효조에 접종 후 우선 12시간 동안 회분배양을 수행하였다. 회분배양 시 최종 세포성장은 건조 세포량으로 2.4 g/l까지 이루어졌으며, 이때 배지 내 glycerol 농도는 15.4 g/l이었다. 항시적 발현 시스템의 사용으로 인해 trehalose synthase의 활성은 세포성장과 동시에 나타났으며, 회분배양 마지막에 그 활성은 11.6 U/ml을 나타냈다. 유가배양의 탄소원인 glycerol은 농도가 최소 10 g/l 이하로 떨어지지 않도록 공급하였다. 배지 공급에 따라 세포의 성장은 점차 증가하였으며 48 시

간까지 조업하였다. 유가배양 완료 후 최종 건조 세포량은 21.6 g/l이었으며, trehalose synthase 활성은 세포 성장에 따라 증가하는 모습을 보여 최종 13.7 U/ml에 이르렀다.

Trehalose synthase의 유가발효는 shaking flask 배양에 비해 균체량에서는 20배 이상의 큰 증가를 보여주었으나 효소의 발현량에서는 1/2의 감소를 나타내었다. 현재 균체량의 증가로 인한 효소발현의 억제를 감소시키기 위한 연구가 진행 중이다.

요 약

트레할로스 합성효소 (trehalose synthase)의 효율적인 생산을 위하여, 5 종류의 plasmid를 형질전환 시킨 재조합 *E. coli*를 이용하여 균체생산량과 효소발현량을 비교하였다. Trehalose synthase의 활성은 fusion partner를 이용한 system에서는 활성이 나타나지 않았으며, IPTG 유도 발현 시스템보다 항시적 발현 시스템을 사용하는 *E. coli* K12/pHCETS에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 선별된 재조합 *E. coli* K12/pHCETS를 사용하여 회분식 및 유가배양을 수행하였으며, 유가식 배양의 경우 균체농도는 20 g/l, 최종 trehalose synthase 활성은 13.7 U/ml을 나타내었다. 이러한 결과는 트레할로스 생산을 위한 trehalose synthase가 재조합 *E. coli*의 발효에 의해 경제적으로 생산되어질 수 있다는 가능성을 보여 주었다.

REFERENCES

1. Elbein, A. D. (1974), The metabolism of α, α-trehalose, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**, 227-256.
2. Elbein, A. D. (2003), New insights on trehalose: a multifunctional molecule, *Glycobiology* **13**, 17-27.
3. Trevelyan, W. E. (1956), Studies on yeast metabolism. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation, *Biochem. J.* **62**, 177-182.
4. Nwaka, S. (1998), Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast, *Saccharomyces cerevesiae*, *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* **58**, 197-237.
5. De Virgilio, C. (1994), The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast, *Eur. J. Biochem.* **219**, 179-186.
6. Paiva, C. L. A. and A. D. Panek (1999), Biotechnological applications of the disaccharide trehalose, *Biotechnol. Ann. Rev.* **2**, 293-314.
7. Koh, S., H. -J. Shin, D. S. Lee, and S. Y. Lee (1998), Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*, *Biotechnol. Lett.* **20**, 757-761.
8. Nishimoto, T., T. Nakano, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka (1996), Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 835-839.
9. Nishimoto, T., M. Nakano, T. Nakada, H. Chaen , S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka (1996), Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 640-644.
10. Lee, J. H., K. H. Lee, C. G. Kim, S. Y. Lee, G. J. Kim, Y. H. Park, and S. O. Chung (2005), Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68,** 213219.
11. Saito, K., H. Yamazaki, Y. Ohnishi, S. Fujimoto, E. Takahashi, and S. Horinouchi (1998), Production of trehalose synthase from a basidiomycete, *Grifola frondosa*, in *Esherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 193-198.
12. Koh, S. (1998), Studies on Trehalose Synthase from *Thermus caldophilus* GK24, *Ph.D. Dissertation*, Dept. Agric. Chem., Korea University, Seoul.
13. Koh, S., J. S. Kim, H. -J. Shin, D. H. Lee, J. D. Bae, D. I. Kim, and D. S. Lee (2003), Mechanistic study of the intramolecular conversion of maltose to trehalose by *Thermus caldophilus* GK24 trehalose synthase, *Carbohydr. Res.* **338**, 1339-1343.
14. Cho, Y. J., S. Koh, D. S. Lee, and H. -J. Shin (2003), Optimization of production of trehalose from maltose using recombinant trehalose synthase from *Thermus caldophilus* GK24, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 8-13.
15. Zhang, X., P. Guo, and G. Jing (2003), A vector with the downstream box of the initiation codon can highly enhance protein expression in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* **25**, 755-760.
16. Terpe, K. (2003), Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523-533.
17. Waugh, D. S. (2005), Making the most of affinity tags, *TIBTECH.* 23, 316-320.
18. Poo, H. Y., J. J. Song, S. P. Hong, Y. H. Choi, S. W. Yun, J. -H. Kim, S. C. Lee, S. G. Lee, and M. H. Sung (2002), Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor-α, *Biotechnol. Lett.* **24**, 1185-1189.