

고압응용 생명과학의 미래

Future of High-pressure Bioscience

김남수 | 바이오나노연구단

Namssoo Kim | Food Bio-nano Technology Research Group

서론

근래에 들어 고압과 다른 기초과학 혹은 생물공학과의 관계를 강화해주는 새로운 개념들이 발견되고 있다. 순수 열역학적 측면에서 볼 때 단백질 안정성의 압력(혹은 온도) 의존성은 상 도형분석(phase diagram analysis)에 의하여 추론할 수 있다. 여기에 유기용매, 단백질 변성제 및 계면활성제와 같은 공용매를 단백질의 안정성을 저해하는 인자로 사용하여 보다 심도있는 분석을 에너지조망 공식(energy landscape formulation)에 의하여 행할 수 있다. 효소 반응의 경우 압력 의존성은 새로운 효소 반응 기구를 밝혀줄 수 있고 압력의 함수로써 용매화, 효소 구조의 변형, 공극 등이 효소 활성을 조절하는 근본적 역할을 수행함이 알려지게 되었으며 이로부터 고압의 생물공학적 응용가능성이 제시되고 있다.

최근에 들어서는 고압처리 중 용액 상 단백질의 구조적, 동력학적, 열역학적 특성을 분자동력 시뮬레이션에 의하여 원자 수준에서 연구하여

국지적 및 분자 전체의 부피 변화에 미치는 압력의 영향(local compressibilities 등)을 측정할 수 있게 되었다. 또한 고압기술의 실제 응용도 점차 성공적인 것으로 나타나 압력살균(온도를 이용한 살균방법인 pasterization에 대비하여 pascalization이라 표현됨)을 병원성 물질을 저해하는데 사용할 수 있게 되었으며 가공육에서의 프리온(prion) 단백질의 전염성을 압력처리에 의하여 불활성화하여 열처리만으로는 불가능한 인체 전염을 방지할 수 있는 실제적 방법으로 발전하게 되었다.

생화학적 공정에 미치는 고압의 영향

고압을 생명과학에 응용할 수 있게 된 것은 1914년 Bridgman이 계란난백을 실온에서 정수압(hydrostatic pressure) 처리하면 응고하여 삶은 달걀의 상태와 비슷한 형태를 나타낸다는 보고에서 시작되었다. 그 후 오랜 동면기를 거친 후 최근

20여 년내 과학자들은 정수압처리가 단백질의 구조와 기능에 미치는 영향에 눈을 돌리게 되었고, 그 결과 이와 관련된 지식이 급격히 축적되고 있다. 이와 같은 발전이 이루어진 원인을 두 가지 측면에서 설명할 수 있는데, 먼저 기술적 측면에서 보면 순수물리학의 기술이 생명과학에 이용되어 고압하에서 반응동력학, 변성체적, 원자거동 등의 다양한 이화학적 현상을 측정할 수 있는 편리한 장비가 개발되었다는 점을 들 수 있다. 즉 고압하에서 측정가능한 분광학적 기법(광학, 형광분광학, 공명분광학, 현미경학)의 발달, X선 결정학, 중성자회절법 등의 구조분석법에 의하여 고압하에서의 생물물리학이 새롭게 발달하게 된 점을 들 수 있다. 두 번째 이유로는 BINT 기술의 발전으로 인하여 확보한 정확한 실험자료에 대하여 복잡한 계산을 할 수 있게 된 점을 들 수 있다.

생명과학자들은 대개의 경우 화학적 개념을 생명과학에 성공적으로 적용하고 있는데, 그 대표적인 것이 화학반응에 대하여 Eyring이 제안한 전이상태이론(transition state theory)이다. 최근 문헌을 보면 반응단계들을 활성화에너지 혹은 활성화체적의 형태로 정량화한 반응 속의 함수로서의 에너지 전위에 대한 도식을 볼 수 있다. 한편 과학자들은 압력효과에 대한 연구를 생물체의 특정구성체인 세포, 막, 단백질, 효소 등에 집중해 왔는데, 효소 촉매작용의 선형적 및 비선형적 압력의존성을 압력과 다른 환경변수(온도, 용매, pH)와의 상호 의존성 측면에서 분석하여 효소의 언폴딩 변화, 압축성 변형, 다른 율속단계를 만드는 압력에 의해 유도된 변화를 규명하는 연구를 예로 들 수 있다.

전이상태이론: 과거와 미래

효소 촉매작용의 매개변수(K_m , k_{cat} 등)의 압력 의존성과 관련하여 human butyrylcholinesterase, enolase, thermolysin, dehydrogenase에 대한 연구가 심도 있게 수행되었으며, 그 결과 동위원소 효과에 미치는 압력의 영향과 같은 새로운 개념이 정립되었고, 이로부터 전체 동위원소 효과는 양자물리학적 수소터널링과 같은 전이상태 현상에서 유래함이 밝혀졌다. 효소의 구조는 변화하므로 어떤 반응경로의 중간체간에는 가역반응상수를 결정하는 활성화 복합체가 있다고 가정할 수 있다. 효소 반응의 한 단계를 stopped-flow법과 같은 신속동력학 방법에 의하여 측정할 경우 전이상태이론을 효소 반응의 기본적인 열역학적 원리를 발전시키는데 적합하게 적용할 수 있다.

효소의 올리고머 구조와 활성 간의 관계에 있어서 기존에는 정수압 처리에 의하여 생성되는 대부분의 모노머는 활성을 상실한다고 생각되어 왔다. 그러나 올리고머 구조를 변성시키는데 필요한 압력 값은 모노머 단백질을 변성시키는데 필요한 것보다 낮으므로 이론적으로는 압력에 의하여 특정 올리고머 단백질이 해리되는 경우에도 생성된 모노머의 2차 및 3차 구조는 거의 영향을 받지 않고 유지될 것으로 기대된다. 효모 enolase에 대한 최근 연구에 따르면 서브유니트 접촉면이 좁고 극성을 띤다는 점이 정수압 처리에 의하여 이 효소가 미변성 구조를 지닌 모노머로 해리하는 원인임이 밝혀지고 있다.

최근 및 미래의 고압응용

구조변화의 수단

압력은 온도와 함께 단백질의 3차구조를 안정시키는 수소결합(hydrogen bond), 소수성 상호작용(hydrophobic interaction), 정전기적 상호작용(electrostatic interaction)과 같은 비공유결합의 재배열 및 파괴를 통하여 단백질의 특성에 영향을 미쳐 생물반응의 속도 및 평형상수를 변화시키는 것으로 알려져 왔다. 그뿐만 아니라, 그들의 용매화 셸(shell) 및 단백질 상호 간에 강하게 상호작용을 이루므로 압력, 온도, 화학변성제에 의하여 유도되는 폴딩 및 언폴딩은 복잡한 과정을 거쳐 나타날 것으로 예상된다. 이 때 가장 빈번하게 관찰되는 현상은 미변성 및 변성구조 간의 이상전이이며 때때로 중간상태로써 용융구체(molten globule)가 관찰되어 진다.

적당한 수준으로 압력 처리하면 생단백질(native protein) 및 변이단백질의 활성 손실로 이어질 수 있는 단백질 응집을 되돌릴 수 있는데 그 예의 하나로써 당화단백질(glycosylated protein)인 bikunin을 포유동물 세포배양에 의하여 생산할 때 100~300 MPa의 압력처리에 의하여 응집이 억제되는 현상을 들 수 있다.

한편, 고압은 불용성의 섬유상 단백질 응집물인 아밀로이드(amyloid) 형성을 이해하는 새로운 수단으로서의 가치가 있으므로 의학적 응용이 기대된다. 유전분증(amyloidosis)은 아밀로이드가 형성되는 공통적인 특성을 지니는 다양한 형태의 질병 및 병리학적 상태이다. 아밀로이드 형성에 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 부분적 폴딩 상태의 특

성을 규명하는데 고압처리가 도움이 되는 것으로 알려지고 있다. 갑상샘 호르몬인 thyroxine의 혈청 및 뇌척수액 중 운반체인 transthyretin의 펩티드 단편의 경우 응집 과정의 초기 종류는 220 MPa의 비교적 낮은 고압처리에 의하여 해리되는 반면 성숙 섬유체의 경우에는 1.3 GPa의 압력처리에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

Winter 실험실이 최근 발표한 괄목할만한 연구 결과로는 고압이 원형의 인슐린 아밀로이드 생성을 촉진한다는 것인데 이로부터 정상적 아밀로이드 섬유 내 빈 공간의 이방성 분포(anisotropic distribution)를 유추할 수 있다. 이와 같이 고압처리가 단백질에 미치는 영향과 고해상도 원자 힘 현미경(high-resolution atomic force microscopy)의 응용에 의하여 섬유성연축(fibrillation)에 미치는 몇몇 변수들의 역할이 밝혀지고 있다. 즉 인슐린 응집물의 유전분적 자기조립화(self-assembly) 및 인슐린 아밀로이드 성장의 개시에 미치는 에탄올의 역할이 분광학적 방법과 열량측정법의 조합에 의하여 규명되고 있다. 특히 압력동요 열량측정법(pressure perturbation calorimetry analysis)을 프리온 폴딩 및 β -sheet 변환과정에 적용하여 수화 및 패킹효과를 분석한 것은 최근의 큰 발전으로 여겨진다.

고압이 용융구체와 같은 폴딩 중간물의 안정화를 이루는 점을 이용하여 생물공학 및 암, 유전분증, 알츠하이머, 파킨슨증, 프리온 유도질환과 같은 인체병리학의 중요한 이슈의 하나인 용해성 응집물의 형성기구를 규명하는 연구가 수행되고 있다. β -Sheet 구조는 압력 값에 따라 가역적으로 형성됨이 밝혀지고 있으며 프리온 단백질의 구조전이과정에 132~160까지의 아미노산이 주요한 역할을 수행함이 알려지게 되었다.

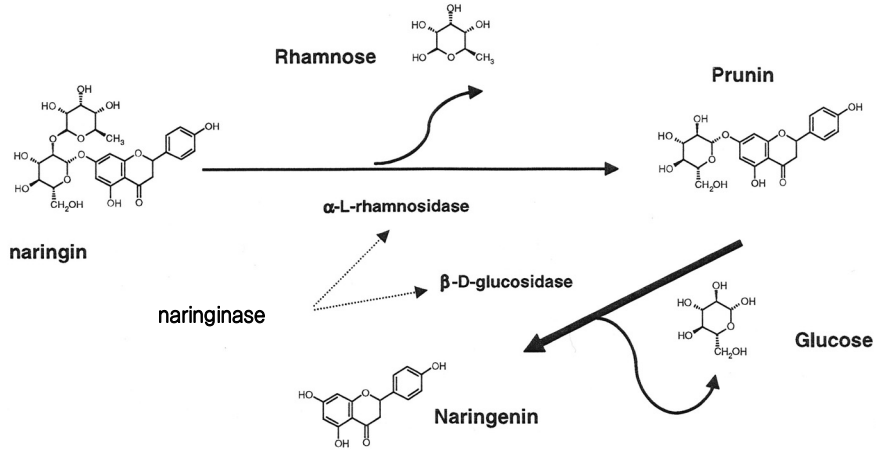


그림 1. 알파-람노시다제 및 베타-D-글루코시다제 활성을 포함하고 있는 나린지나제에 의한 나린진의 프루닌, 람노즈, 나린제닌, 글루코스로의 가수분해

생물산업에의 응용

고압처리 공정 및 장비의 개발은 식품산업에서 현저하여 수 리터에서 수십 리터 용량의 대규모 고압 처리장비가 상용화되고 있다. 생물산업 분야에서 고압처리 응용 예의 하나로서 감귤류 플라보노이드 성분인 naringin의 naringenin으로의 변환을 들 수 있으며(그림 1), 이 두 화합물은 헬스케어, 식품 및 농업

분야의 주요한 기능성물질로 사용될 수 있다. 전자는 감귤류의 주성분이지만 쓴맛이 있으므로 이를 효소에 의하여 후자로 변환하는 공정의 산업적 가치는 매우 높다. 고압처리에 의하여 naringinase의 효소 특성이 크게 증진되고(그림 2, 3) 반응산물 생성의 최대초기 속도(V_{max})가 상압(ambient pressure)에서보다 크게 증진됨을 알 수 있었는데 이 사실은 식품산업에서 고압처리의 응용 전망이 매우 밝음을 시사하고 있다.

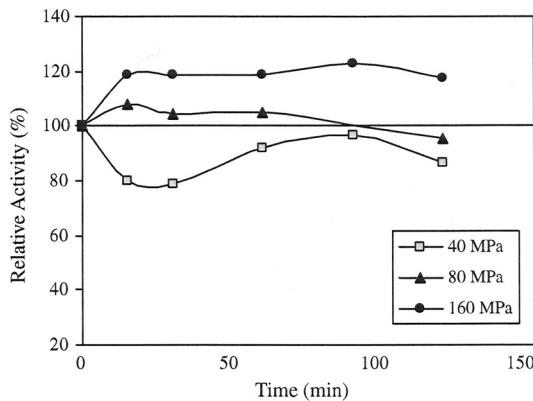


그림 2. 303 K에서 압력에 따른 나린지나제의 상대활성(초산완충용액, pH 4.0 사용)

생물산업에서의 다른 응용 예로는 가공육에서의 프리온 단백질 전염성을 초고압처리에 의하여 불활성화하는 것을 들 수 있다. Proteinase K 저항성을 프리온 불활성화의 분석지표로 하고 햄스터를 실험 동물로 하여 수행된 최근의 연구에 따르면 1000 MPa 까지 초고압처리한 경우 병증의 발생을 크게 지연할 수 있으며 유아식품의 경우 높은 수준으로 정수압 처리하면 살균 온도보다 낮은 온도에서 안전한 제품을 제조하는데 유용할 수 있다고 보고되고 있다.

고압응용의 새로운 분야

기술적 측면

단백질 폴딩을 보다 잘 이해하기 위한 새로운 시도가 이루어지고 있다. 그 현저한 예로써 단백질 폴딩연구를 고해상도 핵자기공명법(high-resolution nuclear magnetic resonance) 및 고압처리를 조합

하여 수행하는 것을 들 수 있는데 이 때 NMR 스냅사진을 이용하여 단백질의 구조변화를 분석한다. 큰 진전을 보이고 있는 다른 분야로는 고압하에서의 단백질 결정화를 들 수 있다. 주지하는 바와 같이 단백질의 용해도는 압력에 의존하므로 결정의 형성속도 역시 압력에 따른다. 지금까지의 연구결과에 의하면 고압하에서 단백질 결정화를 행하면 결정의 질이 향상됨이 밝혀졌고 고품질의 단백질 결정을 정수압처리에 의하여 아가로스 겔로부터 제조할 수 있음이 보고되고 있다. 한편, cowpea mosaic virus의 경우 330 MPa의 압력으로 처리한 후 2.8 Å의 해상도로 분석 시 상압에서의 구조에 비하여 구조의 질서가 증가하여 그 결과로써 Debye Waller 인자가 감소하고 물분자의 배열이 질서를 띠게 된다고 한다.

생명현상의 연구

현대 분자생물학에 의하면 생명이 유전정보를 보존하는 동시에 화학반응을 수행한 RNA 분자를

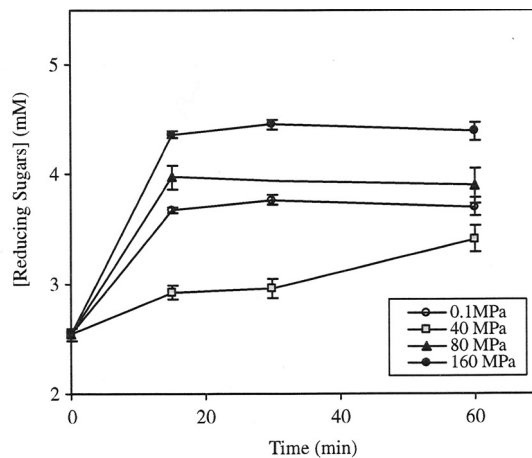


그림 3. 나린지나제 활성에 미치는 압력의 효과. 생물전환반응은 303 K에서 초산완충용액(pH 4.0)을 사용하여 수행됨 (나린지나제 = 250 mg/dm³, 나린진 = 1.23 mM).

포함한 분자조상으로부터 유래하고 있다고 알려지고 있다. Hairpin 라이보자임의 촉매기구에 대한 고압응용연구로부터 라이보자임에 있는 두 개의 루프가 전이상태를 형성하는 동안 서로 긴밀하게 접촉하고 있는 것으로 관찰되었다. 바이러스 연구에서의 압력의 응용도 매우 전망이 밝은데 이는 불활성화 구조체의 면역원성과 관련하여 연구해야 할 주제의 하나가 바이러스 해리현상이기 때문이다. 담배모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus, TMV)를 모델로 한 실험결과 바이러스 불활성화 정도는 압력과 pH 조절에 의하여 최적화할 수 있었다.

미생물 불활성화

미생물 불활성화는 식품산업 분야의 근본적 이슈의 하나이다. 고압응용과 관련하여 큰 진전을 보이는 분야로는 우선 조개류에 있는 박테리아 병원균의 불활성화를 들 수 있다. 굴에 오염된 A형 간염 바이러스는 높은 수준의 정수압처리에 의하여 불활성화 되었고 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Lactobacillus plantarum*도 0°C 근처에서 동결하지 않은 상태로 고압 처리하면 불활성화되는 것으로 나타났다. *Bacillus* 내생포자(endospore)의 압력에 의한 불활성화도 보고되고 있고 으깬 당근의 경우 200-800 MPa과 60~80°C 조건에서 처리하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

고압기술 발전에 필요한 분야

먼저 분자 시뮬레이션과 같은 생물분자에 대한

고압효과의 이론적 측면이 개발되어야 할 것으로 생각된다. 이를 통하여 현재 사용되고 있는 열역학 개념보다 발전된 개념을 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 두 번째 측면으로는 하드웨어와 방법적 측면을 들 수 있는데, 이는 고압용기를 복잡한 생물물리학적 장비와 결합시키고 다이아몬드 모루와 간편한 내부게이지를 개발하는 것 등을 포함하며 이와 같은 조건을 갖춘 미래형 고압장비는 광학적 측면과 현미경 장치와의 결합성이 크게 증대될 것으로 기대된다. 세 번째 분야는 식품공정과 관련하여 고압과 온도의 조합, 예를 들어 고압과 저온(HP/LT) 조합에 의하여 저온살균효과가 기대되는 신공정을 개발하는 것이다. HP/LT 공정은 냉 저온살균 효과를 기대할 수 있어 가압에 따른 미생물 사멸효과가 실온에서 보다 현저히 높고 상압동결 시 나타나는 식품 구조의 부정적 영향을 배제할 수 있는 장점이 기대되고 있다.

결론

고압응용기술은 아직도 초창기에 있고 앞으로 많은 기술적 발전이 기대된다. 식품산업에 국한하여 고찰해보면 향후 청정기술로서 연구 및 산업 수요가 높아질 것으로 기대된다. 본 역자가 기존 자료를 고찰한 결과, 식품산업 분야에서는 향후 단백질, 거대분자 연구, 지질 이중막, 지질-단백질 상호작용, 효소 특성, 신 효소반응 개발, 세포생리, 분자생물 연구, 식품미생물 연구, 식품겔, 식품살균, 냉동, 해동, 고압조건하 측정 장비 개발, 심해현상 연구 등에 고압기술의 응용가능성이 기대된다.

● 참고문헌 ●

1. Balny C, What lies in the future of high-pressure bioscience?, *Biochim Biophys Acta*, **1764**, 632-639, 2006
2. Hayashi R, Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Elsevier, 2002
3. Real HJ, Alfaia AJ, Calado ART, Ribeiro MHL, High pressure-temperature effects on enzymatic

activity: Naringin bioconversion, *Food Chemistry*, **102**, 565-570, 2007

김 남 수 농학박사

소 속 : 한국식품연구원 바이오토포연구단

전문분야 : 식품바이오센서 및 식품효소공학

E-mail : nskim@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9131

본 내용은 고압연구 분야의 전문가 중 한 사람인 프랑스 Montpellier 대학의 Claude Balny 교수의 'What lies in the future of high-pressure bioscience? (*Biochim Biophys Acta*, **1764**, 632-639, 2006)'를 위주로 작성하였으며 여기에 다른 논문 및 책의 내용을 부분적으로 첨가하였습니다.