

극한성 미생물 *Deinococcus geothermalis* 유래 재조합 글루코아밀레이즈의 전 분 분해 활성 특징

Characterization of the Starch Degradation Activity of recombinant glucoamylase from Extremophile *Deinococcus geothermalis*

장승원^a, 권덕호^b, 박재범^b, 정종현^c, 하석진^{b*}

Seung-Won Jang^a, Deok-Ho Kwon^b, Jae-Bum Park^b, Jong-Hyun Jung^c and Suk-Jin Ha^{b*}

^a ForBioKorea Co., Ltd., Seoul, 08592 Republic of Korea

^b Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

^c Research Division for Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 56212, Republic of Korea

Received 17 September 2019; Revised 7 October 2019; Accepted 7 October 2019

Abstract

This work focused on characterization of the starch degradation activity from extremophile strain *Deinococcus geothermalis*. Glucoamylase gene from *D. geothermalis* was cloned and overexpressed by pET-21a vector using *E. coli* BL21 (DE3). In order to characterize starch degrading activity of recombinant glucoamylase, enzyme was purified using HisPur Ni-NTA column. The recombinant glucoamylase from *D. geothermalis* exhibited the optimum temperature as 45°C for starch degradation activity. And highly acido-stable starch degrading activity was shown at pH 2. For further optimization of starch degrading activity with metal ion, various metal ions (AgCl₂, HgCl₂, MnSO₄·4H₂O, CoCl₂·6H₂O, MgSO₄, ZnSO₄·7H₂O, K₂SO₄, FeCl₂·4H₂O, NaCl, or CuSO₄) were added for enzyme reaction. As results, it was found that FeCl₂·4H₂O or MnSO₄·4H₂O addition resulted in 17% and 9% improved starch degrading activity, respectively. The recombinant glucoamylase from *D. geothermalis* might be used for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process at high acidic conditions.

Keywords: *Deinococcus geothermalis*, glucoamylase, pET-21a vector, simultaneous saccharification and fermentation

1. 서론

지속되는 화석연료의 소비에 따른 지구 온난화 및 고유가 시대에 맞춰 석유를 대체할 수 있는 새로운 에너지로서 바이오 에탄올의 보급의 필요성이 높아지고 있다^[1]. 바이오 에탄올은 사탕수수, 옥수수, 보리, 벧짚 등의 당질계, 전분질계 또는 섬유소계 바이오매스를 원료로 생물공정과정을 거쳐 생산되며 휘발유와 같은 화석 연료와 비교하여 오염물질을 배출하지 않아 친환경적이며, 재생 가능한 원료로부터 생산된다는 장점을 가지고 있다^[2, 3]. 또한 화석 연료의 고갈 문제와 온실가스 증가에 따른 지구 온난화 현상을 완화할 수 있는 이점을 가지고 있다.

사탕수수, 옥수수와 같은 식용이 가능한 바이오매스의 경우, 윤리적인 문제뿐만 아니라 생산 비용이 증가됨에 따라 가격 경쟁력이 떨어지기 때문에, 폐목재, 벧짚 같은 목질계 바이오매스 즉, 비식용 바이오매스를 이용한 바이오 에탄올 생산 연구가 이루어지고 있다^[4-6]. 목질계 바이오매스도 전처리 공정에서의 높은 비용과 이후 에탄올로 전환되는 당의 수율이 낮은 문제점으로 인해 연구에 어려움을 겪고 있다^[2, 3]. 결과적으로 더 저렴한 바이오매스의 개발과 높은 에탄올 생산성을 갖는 효율적인 공정 개발이 필요하다^[4]. 현재로서는 바이오매스를 이용한 동시당화 발효가 해결책이라 사료되어 전분을 이용한 동시당화발효(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)에 관한 연구가 수행되고 있다^[7-9].

* Corresponding author. Tel.: +82-33-250-6278

fax: +82-33-243-6350

E-mail address: sjha@kangwon.ac.kr (Suk-Jin Ha).

동시당화발효란 전분의 액화, 당화, 발효 각각의 나누어진 공정을 하나의 생물반응기를 이용하여 한 번의 공정으로 에탄올을 생산하는 방법이다^{10, 11}. 이는 곧 공정에 들어가는 시간과 비용을 감소할 수 있다는 장점을 가지고 있지만, 동시당화발효를 수행하기 위해서는 효소와 당화과정과 효모의 발효과정에서의 최적 조건이 다른 부분을 해결해야 한다¹². 일반적으로 효소의 당화과정은 높은 온도에서 당화율이 높은 반면에, 상업적으로 널리 사용되는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 발효과정에서 높은 온도는 미생물의 생육에 영향을 주어 고수율의 에탄올을 생산하지 못하는 한계를 가지고 있다^{1, 13}.

본 논문에서는 당화과정에 사용한 *D. geothermalis* 균주 유래 재조합 글루코아밀레이즈의 효소적 특성을 확인하여, 동시당화발효 공정에서 문제의 해결방안을 모색하기 위한 연구를 진행하였다.

2. 결과 및 고찰

2.1 재조합 글루코아밀레이즈의 생산

D. geothermalis 유래의 재조합 글루코아밀레이즈를 클로닝하기 위해 *D. geothermalis* 유래의 Dgeo_0725 유전자를 PCR을 통해서 증폭하였으며 NdeI과 XhoI 제한효소로 처리 후 C-terminal에 6his-tag를 포함하고 있는 pET-21a 벡터를 이용하여 재조합 글루코아밀레이즈의 발현 벡터를 개발하였다. 개발된 글루코아밀레이즈의 발현 벡터(pET21a-dgeo-FJ)를 *E. coli* BL21(DE3)에 도입한 후 엠펜실린 (100 µg/mL)이 포함된 LB 배지에서 37°C 온도조건으로 14시간 동안 배양하여, 재조합 대장균(FMEL-J1)을 선별하였다. FMEL-J1 균주로부터 IPTG를 이용하여 단백질 발현을 유도한 후 과 발현된 재조합 글루코아밀레이즈를 포함하는 배양액을 원심분리하였다. 분리된 용액의 상등액을 제거하고 세포만 회수하여 sonicator를 사용하여 세포 파쇄를 수행하였다. 세포가 파쇄된 전체 혼합액에서 수용성 분액만을 분리한 후, HisPur Ni-NTA purification kit를 사용하여 정제

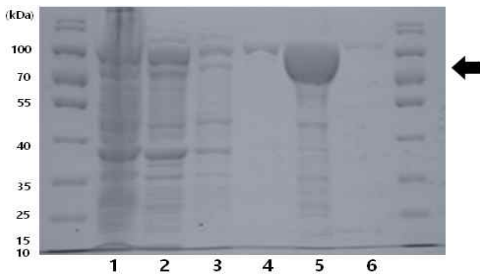


Fig. 1 SDS-PAGE of purified recombinant glucoamylase (87.5 kDa) from FMEL-J1 using HisPur Ni-NTA column. (lane 1: cell extract, lane 2: passing through, lane 3: washing buffer, lane 4: elution1, lane 5: elution2, lane 6: elution3).

하였으며 SDS PAGE를 이용하여 재조합 글루코아밀레이즈의 크기와 발현량 등을 확인하였다(Fig. 1).

2.2 재조합 글루코아밀레이즈의 온도 및 pH 조건 최적화

재조합 글루코아밀레이즈의 최적 반응 온도를 확인하기 위하여 반응 온도 범위를 30°C-55°C로 5°C 간격으로 설정하여 효소 반응을 진행하였다. 효소 활성을 측정하기 위해 20 g/L 수용성 전분을 포함하고 있는 10 mM glycine buffer(pH 2.0)의 반응 혼합물을 이용하여 분석하였다. 온도를 조절하여 5°C 간격으로 효소 반응 활성을 측정해 본 결과, 45°C에서 생성된 포도당의 농도는 11.47 g/L로 최대 효소 활성을 나타냈으며, 40°C는 9.5 g/L를 그리고 50°C는 8.8 g/L를 나타냈다(Fig. 2A). 이 결과를 통해 *D. geothermalis* 유래의 재조합 글루코아밀레이즈의 최적 반응온도는 45°C임을 확인하였다.

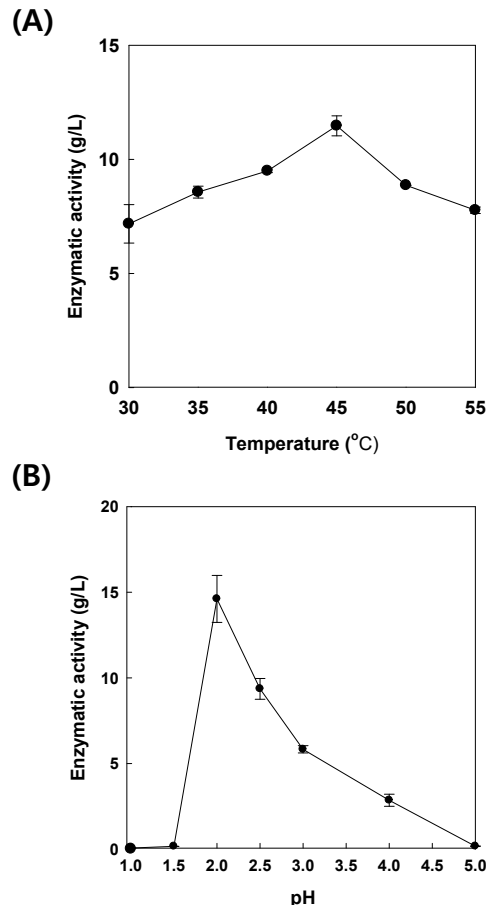


Fig. 2 Enzymatic activity of recombinant glucoamylase from *D. geothermalis* for optimum temperature and pH.

재조합 글루코아밀레이즈의 최적 반응 pH를 확인하기 위하여 효소 반응 혼합물에 pH 변화를 주었다. Glycine-HCl buffer로 pH를

조정하여, pH 1.0-5.0 범위에서 반응 후 분석하였다(Fig. 2B). pH 2.0에서 생성된 포도당의 농도는 14.6 g/L로 최대 효소 활성을 나타냈으며, pH 1.5 이하에서는 효소 활성이 거의 없었고, pH 4.0에서 최대 반응 pH의 39.8%(5.8 g/L)의 활성을 보였다. 일반적으로 알려져 있는 글루코아밀레이즈의 최적 반응 pH는 pH 4.0-6.0 사이로 알려져 있지만^{4, 13, 14}, 이번 연구를 통해 개발된 *D. geothermalis* 유래의 재조합 글루코아밀레이즈의 pH는 pH 2.0에서 최대 활성을 나타내는 특이성을 확인할 수 있었다.

2.3 재조합 글루코아밀레이즈의 열 안정성 확인

재조합 글루코아밀레이즈의 열 안정성을 확인하기 위해 멸균된 tube를 이용하여, 30°C, 40°C, 45°C water bath에 온도 조건에 따라 최대 24시간까지 각각 보관하였다. 그 후 20 g/L 수용성 전분을 포함하고 있는 반응 혼합물에 온도 조건 별로 보관된 재조합 글루코아밀레이즈를 200 μ L씩 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. 각각의 온도 조건에서 생성된 포도당은 30°C 조건에서 13.64 g/L, 40°C 조건에서 13.32 g/L, 45°C 조건에서 12.77 g/L로 각각 0시간과 비교하여 포도당이 1.37 g/L, 1.69 g/L, 2.24 g/L 감소하였다(Fig. 3). 최대 보관 온도인 45°C에서 24시간 보관 후, 효소 활성이 약 14.9%(2.24 g/L) 감소된 것으로 보아 호열성 미생물인 *D. geothermalis* 유래의 재조합 글루코아밀레이즈의 우수한 열 안정성을 확인할 수 있었다¹⁵⁻¹⁷.

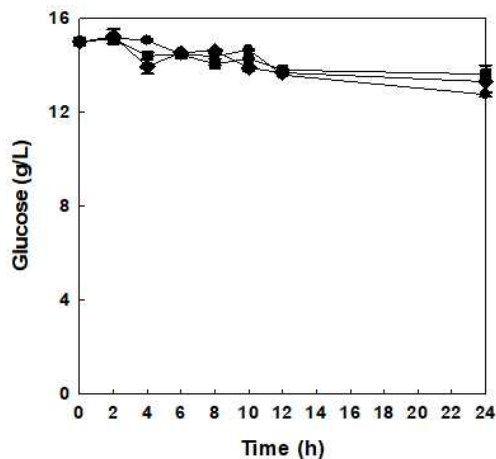


Fig. 3 Thermal stability of recombinant glucoamylase from *D. geothermalis*. Symbols: Enzymatic activity 30°C(■), 40°C(◆), 45°C(●).

2.4 효소 활성에 대한 금속이온의 효과

10 종류의 금속이온(AgCl₂, HgCl₂, MnSO₄·4H₂O, CoCl₂·6H₂O, MgSO₄, ZnSO₄·7H₂O, K₂SO₄, FeCl₂·4H₂O, NaCl, or CuSO₄)의 첨가에 따른 재조합 단백질의 활성 비교하기 위해 각각의 금속 이온 10 mM

을 효소-기질 반응 혼합물(전분2%, glycine pH 2.0)에 첨가하여 반응 후, 효소 활성을 측정하였다. 10 가지의 금속 이온 중 MnSO₄·4H₂O 또는 FeCl₂·4H₂O를 첨가한 경우에 각각 109.2%, 117.4%로 control군에 비해 relative activity가 증가한 것을 확인하였다(Table 1). 이전 연구발표에 따르면 NaCl, MgSO₄, CoCl₂·6H₂O, K₂SO₄, ZnSO₄를 각각 첨가한 경우 *Rhizopus oryzae* WCS-1 유래의 글루코아밀레이즈의 경우엔 control군에 비해 110% 이상 relative activity가 증가하는 것을 확인하였는데, 본 연구의 *D. geothermalis* 유래의 재조합 글루코아밀레이즈에서는 효소활성의 증가를 확인할 수 없었다¹³. 반면에 이전 연구발표에 따르면 HgCl₂, 또는 AgCl₂의 금속 이온의 경우 inactivator로 작용하여 각각 12.4%, 28.5% 활성이 저해된 결과를 확인하였는데¹³, 본 연구의 *D. geothermalis* 유래의 재조합 글루코아밀레이즈는 각각 90.8%, 96.7%로 효소 활성이 크게 감소되지 않는 결과를 확인하였다. *D. geothermalis* 유래의 재조합 글루코아밀레이즈의 활성을 증가시키는 효과를 나타내는 금속 이온은 MnSO₄·4H₂O 또는 FeCl₂·4H₂O로 확인되었으며 주로 글루코아밀레이즈의 inactivator로 작용하는 금속 이온에 대해서는 효소 활성을 크게 잃지 않는 것을 확인하였다.

Table 1 Metal ion (AgCl₂, HgCl₂, MnSO₄·4H₂O, CoCl₂·6H₂O, MgSO₄, ZnSO₄·7H₂O, K₂SO₄, FeCl₂·4H₂O, NaCl, or CuSO₄) effects on enzymatic activity of glucoamylase from *D. geothermalis*.

Metal ion	Relative activity (%)	Metal ion	Relative activity (%)
Fe ²⁺	117.40±0.10	Na ⁺	98.46±0.22
Mn ²⁺	109.17±3.00	Mg ²⁺	97.53±0.29
Cu ²⁺	105.05±0.28	Zn ²⁺	97.12±0.14
K ⁺	102.99±0.05	Hg ²⁺	96.70±0.06
Co ²⁺	100.31±0.14	Ag ²⁺	90.83±0.10

10 mM metal ion

3. 실험재료 및 방법

3.1 재료

미생물 배양에 사용되는 yeast extract, bacto peptone, luria-bertani(LB) broth, agar는 Becton, Dickinson and Company (NY, USA)로부터 구매하였으며 전분(starch)과 황산은 Sigma Aldrich (MO, USA)에서 구매하였고 다른 화학약품은 모두 analytical grade 제품을 이용하였다. 재조합 단백질의 과 발현을 위해 사용한 pET-21a 벡터와 *E. coli* BL21(DE3) 균주는 아주대학교(Suwon, Korea)에서 제공받았다. pET-21a 벡터 시스템 개발을 위한 제한효소 NdeI와 XhoI는 Enzymomics(Daejeon, Korea)의 제품을 이용하였으며,

IPTG(Isopropyl thiogalactopyranoside)는 Bioseang (Korea)에서 구매하였고, SDS PAGE에 사용한 시약들은 Bio-Rad Laboratories(USA)에서 구매하였다. 단백질 정제를 위한 his-tag Ni NTA kit는 Thermo Fisher Scientific(USA)에서 구매하였다.

3.2 재조합 글루코아밀레이즈의 발현시스템 개발 및 발현 조건

당화를 위한 재조합 단백질은 *D. geothermalis* 유래의 Dgeo_0725 유전자와 C-terminal에 6his-tag를 포함하고 있는 pET-21a 벡터를 이용하였다. Dgeo_0725 유전자와 pET-21a 벡터를 각각 NdeI과 XhoI 제한효소로 처리하여 벡터에 삽입 후, *E. coli* Top10을 이용하여 발현 벡터를 개발하였다. 단백질의 과발현을 위해 개발된 벡터 (pET21a-dgeo-F3)를 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하여, 재조합 대장균을 개발하였다. 재조합 대장균을 엠포실린(100 μ g/mL)이 포함된 LB 배지에서 37°C, 250 rpm으로 14시간 동안 배양하였다. 배양된 균을 50 mL LB 배지에 1% (v/v) 접종하여 optical density(O.D₆₀₀) 0.4-0.5까지 배양 후, 0.5 mM IPTG를 첨가하여, 20°C 온도조건에서 16시간 동안의 발현을 유도하여 글루코아밀레이즈를 과발현하였다.

3.3 재조합 글루코아밀레이즈의 생산 및 정제

과 발현된 글루코아밀레이즈를 포함한 배양액을 10분 동안 원심 분리(Supra 22K, rotor 11) 후, 상등액은 제거하고 pellet만 회수하여 lysis buffer pH 7.0(증류수 8.875 mL, 2M imidazole 0.125 mL, 1 mL 10xPBS)를 첨가하여 현탁하였다. 이후 sonicator(CL18, USA)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄는 amplify 40%에 puls on/off를 5, 10초 간격으로 30분 동안 진행하였다. 세포 파쇄가 끝난 후, 원심 분리하여 crude extract를 얻었다. 전체 혼합액에서 수용성 분액과 불용성 분액을 분리하였고, SDS PAGE를 통하여, 재조합 글루코아밀레이즈의 크기와 발현량을 확인하였다. 재조합 글루코아밀레이즈의 정제는 HisPur Ni-NTA purification kit(Thermo Fisher Scientific, Switzerland, USA)를 이용하였다. 1 mL의 crude extract를 HisPur Ni-NTA spin column에 넣은 후, washing buffer로 washing 후, elution buffer를 1mL씩 3회 나누어 흘려 준 후, elution 1, 2, 3로 나누어 회수하였다. 정제된 단백질의 농도는 Bradford reagent assay kit(Biosesang, Korea)를 이용하여 농도를 측정 하였다.

3.4 재조합 글루코아밀레이즈의 효소활성 분석

재조합 단백질의 효소 활성 분석은 glycine-HCl buffer를 이용하였다. 20 g/L 수용성 전분을 포함하고 있는 10 mM glycine buffer (pH 2.0) 800 μ L에 200 μ L의 enzyme(0.5 mg/mL)을 넣어 효소-기질 반응 혼합물을 만들었다. 30분 정도 미리 가열한 45°C water bath(EYELE, SB-1000, Japan)에서 1시간 반응 후 활성을 측정하였다.

최적 반응 온도와 최적 반응 pH를 확인하기 위해, 각각 30°C에서 55°C까지 5°C 간격으로 달리하였으며 pH는 1.0에서 5.0 범위로 glycine-HCl buffer를 이용하여 pH 조정 후 효소 반응을 진행하였다. 열 안정성의 확인은, 재조합 글루코아밀레이즈를 멸균된 1.5 mL ep tube에 넣고, 30°C, 40°C, 45°C water bath에 온도 별로 보관 후 2시간 간격으로 효소 활성을 측정하였다. 금속이온에 대한 효소 활성 분석은 10 종류의 금속이온 10 mM(AgCl₂, HgCl₂, MnSO₄·4H₂O, CoCl₂·6H₂O, MgSO₄, ZnSO₄·7H₂O, K₂SO₄, FeCl₂·4H₂O, NaCl, CuSO₄) 100 μ L에 효소 반응용액 700 μ L, enzyme를 200 μ L 각각 첨가하여 효소 반응을 진행하였다. 모든 실험결과 값은 평균±표준편차로 표시하였으며, 3회 반복 실험하여 평균값을 계산하였다.

3.5 분석방법

세포 성장은 UV-visible spectrophotometer(BioMate 5; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여, 흡광도 (optical density, OD_{600nm})로 관찰하였다. 전분, 포도당, 말토오스의 농도는 HPLC 1200 Series(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)와 refractive index detector(Agilent Technologies)를 이용한 Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) column(Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. Column은 50°C에서 0.6 mL/min 유속에 0.005 N H₂SO₄로 용출하였다.

4. 결론

전분을 분해하는 글루코아밀레이즈 유전자를 호열성 박테리아인 *D. geothermalis*로부터 분리하여 재조합 대장균을 이용하여 대량생산에 성공하였다. *D. geothermalis* 유래의 재조합 글루코아밀레이즈를 His tag-Ni NTA를 이용하여 정제한 하였고, SDS PAGE로 분석하여 단백질의 크기가 87.5 KDa임을 확인하였다. 최적 반응 온도와 pH는 각각 45°C와 pH 2.0임을 확인하였다. 재조합 글루코아밀레이즈의 활성을 증진시키기 위해 10 종류의 금속이온을 각각 10 mM 첨가한 결과, MnSO₄·4H₂O 또는 FeCl₂·4H₂O를 첨가했을 때 효소활성이 증가하였으며, 글루코아밀레이즈의 inactivator로 작용하는 금속 이온에 대해서 재조합 글루코아밀레이즈는 효소 활성을 크게 잃지 않는 것을 확인하였다.

후 기

이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2018R1A6A1A03025582).

References

- [1] Bialas W., Szymanowska D., Grajek W., 2010, Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling, *Bioresource technology*, 101 3126-3131.
- [2] Keith C., 2006, Economic Issues related to bio fuels; a written testimony for field hearing US senate committee on agriculture, rural development, and related agencies.
- [3] Ueda S., 1981, Fungal glucoamylases and raw starch digestion, *Trends in Biochemical Sciences*, 6 89-90.
- [4] Shigechi H., Koh J., Fujita Y., Matsumoto T., Bito Y., Ueda M., Satoh E., Fukuda H., Kondo A., 2004, Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 5037-5040.
- [5] Aggarwal N., Niga P., Singh D., Yadav B., 2001, Process optimization for the production of sugar for the bioethanol industry from Tapioca, a non-conventional source of starch, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 783-787.
- [6] Kim S., Dale B.E., 2004, Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass and bioenergy*, 26 361-375.
- [7] Teixeira L.C., Linden J.C., Schroeder H.A., 1999, Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel, *Renewable Energy*, 16 1070-1073.
- [8] Morales-Rodriguez R., Gernaey K.V., Meyer A.S., Sin G., 2011, A mathematical model for simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of C6 and C5 sugars, *in: Journal of Chemical Engineering*, 19 185-191.
- [9] Mukerjee R., Slocum G., Mukerjee R., Robyt J.F., 2006, Significant differences in the activities of α -amylases in the absence and presence of polyethylene glycol assayed on eight starches solubilized by two methods, *Carbohydrate research*, 341 2049-2054.
- [10] Huang L.P., Jin B., Lant P., Zhou J., 2005, Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*, *Biochemical Engineering Journal*, 23 265-276.
- [11] Kim N., Kim J.S., 2004, Acetic Acid Production from Cellulosic Biomass by Simultaneous Saccharification and Fermentation, *Theories Applicat., Chem., Eng10*, 1546-1549.
- [12] Oh K.W., Kim M.J., Kim H.Y., Kim B.Y., Baik M.Y., Auh J.H., Park C.S., 2005, Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasserii* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*, *FEMS microbiology letters*, 252 175-181.
- [13] Jang S.W., Kim J.S., Park J.B., Jung J.H., Park C.S., Shin W.C., Ha S.J., 2015, Characterization of the starch degradation activity from newly isolated *Rhizopus oryzae* WCS-1 and mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae* for efficient ethanol production from starch, *Food science and biotechnology*, 24 1805-1810.
- [14] Panek A., Pietrow O., Synowiecki J., 2012, Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic nanoparticles, *Starch-Stärke*, 64 1003-1008.
- [15] Ferreira A.C., Nobre M.F., Rainey F.A., Silva M.T., Wait R., Burghardt J., Chung A.P., Da Costa M.S., 1997, *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47 939-947.
- [16] Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Minton K.W., Koonin E.V., Daly M.J., 2001, Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 44-79.
- [17] Brim H., McFarlan S.C., Fredrickson J.K., Minton K.W., Zhai M., Wackett L.P., Daly M.J., 2000, Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments, *Nature biotechnology*, 18 85.