

PET분해효소(PETase) 과발현 전세포 촉매의 해양미세플라스틱 생분해 활성 연구

Biodegradation of marine microplastics by the whole-cell catalyst overexpressing recombinant PETase

김현지¹, 박종하¹, 박애란¹, 이대희³, 전준호², 권혁택¹, 임성인^{1*}

Hyunji Kim¹, Jong-Ha Park¹, Ae-Ran Park¹, Dae-Hee Lee³, Joonho Jeon², Hyuk Taek Kwon¹, Sung In Lim^{1*}

¹대학원생, 부경대학교 화학공학과, 부산광역시, 48513, 대한민국

²교수, 부경대학교 소방공학과, 부산광역시, 48513, 대한민국

³교수, 강릉원주대학교 해양식품공학과, 강원도 강릉시, 25457, 대한민국

¹Pukyong National University/Department of Chemical Engineering, Busan 48513, Republic of Korea

²Pukyong National University/Department of Fire Protection Engineering, Busan 48513, Republic of Korea

³Gangneung-Wonju National University/Department of Marine Food Science and Technology, Gangwon-do 25457, Republic of Korea

(Received 27 Nov 2022, Revised 23 Dec 2022, Accepted 23 Dec 2022)

Abstract The increased production and consumption of polyethylene terephthalate (PET)-based products over the past several decades has resulted in the discharge of countless tons of PET waste into the marine environment. PET microparticles resulting from the physical erosion of general PET wastes end up in the ocean and pose a threat to the marine biosphere and human health, necessitating the development of new technologies for recycling and upcycling. Notably, enzyme-mediated PET degradation is an appealing option due to its eco-friendly and energy-saving characteristics. PETase, a PET-hydrolyzing enzyme originating from *Ideonella sakaiensis*, is one of the most thoroughly researched biological catalysts. However, the industrial application of PETase-mediated PET recycling is limited due to the low stability and poor reusability of the enzyme. Here we developed the whole-cell catalyst (WCC) in which functional PETase is attached to the outer membrane of *Escherichia coli*. Immunoassays are used to identify the surface-expressed PETase, and we demonstrated that the WCC degraded PET microparticles most efficiently at 30°C and pH 9 without agitation. Furthermore, the WCC increased the PET-degrading activity in a concentration-dependent manner, surpassing the limited activity of soluble PETase above 100 nM. Finally, we demonstrated that the WCC could be recycled up to three times.

Keywords : Microplastic, Enzyme, Whole-cell biocatalyst, recycling, PET

* Corresponding author

Phone: +81 51 629 6435 Fax: +81 51 629 7487

E-mail: silim@pknu.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

서론

폴리에스터 수지의 일종인 폴리에틸렌 테라프탈레이트(이하 PET)는 결정성 또는 비결정성 열가소성 플라스틱으로 가볍고 저렴하며 가공성 및 내구성 또한 좋기에 다양한 산업 분야에서 널리 사용되고 있다. 페트병부터 포장, 자동차 부품, 의류 산업 등으로의 PET 응용 범위가 증가함에 따라 세계 PET 시장은 2022년에 392억 3000만 달러에 달하며 향후 10.6%의 연평균 복합 성장률(CAGR)을 보일 것으로 예상된다[1]. 그러나 PET 소비의 증가로 인해 방대한 양의 PET 폐기물이 발행하고 있으며 PET의 견고성은 폐플라스틱의 해양 환경 축적을 가속화한다.

연간 수백만 톤이 유입된다는 해양의 플라스틱 파편은 1970년대부터 화두에 올랐으며, 바닷가에 서식하는 새들의 플라스틱 소비는 이미 1960년대부터 보고되기 시작되었다[2-4]. 여러 연구에서 약 700종의 해양 생물 체내에 PET 파편과 미세플라스틱(직경 0.1 μm~5 mm)이 축적되어 있다는 사실이 보고되었다[5-7]. 기존의 PET 폐기물 처리는 소각 및 매립에 의존하였으나 탄소중립, 환경보존 등의 가치에 맞춰 화학적 수단을 통한 PET 재활용 전략이 시행되고 있다[8-10]. 하지만 해당 재활용 전략은 고에너지와 유해 화학물질의 사용 및 부산물에 의한 2차 환경오염의 위험 등의 단점을 수반하고 있다[11]. 또한, 크기가 작고 염료 함량이 높은 해양 PET 미세플라스틱은 처리 비용이 높아 재활용에서 배제된다는 점, 기

타 성분 함량이 높은 폐섬유 유래 PET 미세플라스틱에 대한 재활용 기술이 부족하다는 점은 향후 기술 개발을 통해 극복해야 할 과제로 남아있다[12].

친환경적인 PET 미세플라스틱 재활용 기술을 마련하기 위해 최근 연구들은 생분해(Biodegradation)에 초점을 맞췄다. 생분해는 박테리아, 균류 등 미생물에 의하여 분해하는 과정으로 친환경 폐기물 처리 기술로 주목받고 있다[13-15]. PET의 생분해는 에스테르 결합을 절단하는 가수분해효소에 의해 이루어진다. 현재까지 다양한 PET 가수분해효소가 확인되었다[16]. 대표적인 사례로, 2016년에 Yoshida 그룹은 PET를 비스(2-하이드록시에틸) 테레프탈레이트(Bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET), 모노(2-하이드록시에틸) 테레프탈레이트(Mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET), 테레프탈산(terephthalic acid, TPA) 및 에틸렌글리콜(ethylene glycol, EG)으로 전환하여 유일한 탄소원으로 사용할 수 있는 *Ideonella sakaiensis* 201-F6을 PET 폐기물 처리장에서 분리하였고 PET 분해 과정에 관여하는 효소인 PETase를 발견하였다(Figure 1). 보조인자(cofactor)가 필요한 다른 PET 가수분해 효소들과 달리 PETase는 단일 효소로만 PET를 분해할 수 있고 다른 효소들에 비하여 5.5배에서 많게는 120배까지의 PET 분해 활성을 보인다는 것이 증명되었다[17]. 또한 여러 PET 가수분해 효소들은 호열성으로 인해 70℃의 높은 온도에서 활성을 보이지만 PETase는 상온(20~

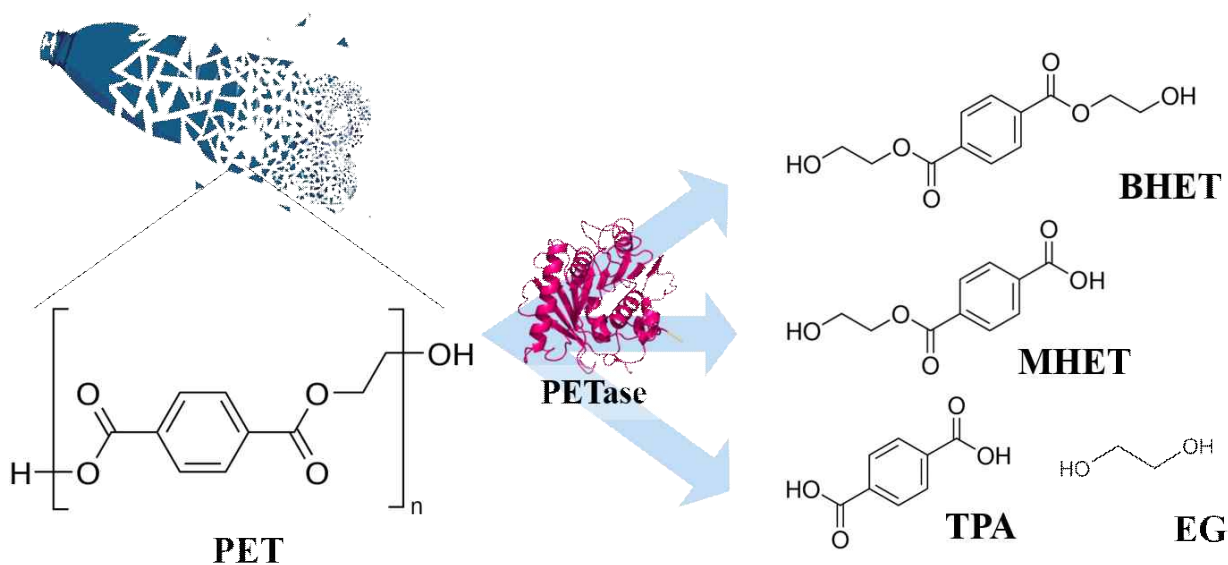


Figure 1. Schematic diagram of PET degradation by PETase.

30°C) 조건에서도 활성화되므로 비용 및 에너지 측면에서도 가장 우수한 PET 분해효소라고 할 수 있다 [16]. 최근 경북대 연구팀은 PETase 효소의 결정구조 정보를 바탕으로 전략적 단백질 진화 기법을 적용하여 내열성과 분해 활성이 크게 개선된 PETase 변종을 개발함으로써 PETase의 산업적 응용 가능성을 높였다[18, 19].

여러 장점에도 불구하고 효소의 단점들은 산업적 응용을 어렵게 한다. 효소가 분해 공정에 적용되기 위해서는 생산 시 정제 과정을 거쳐야 하고 이 과정은 일반적으로 많은 시간과 비용이 소요된다. 정제된 효소는 생분해 반응 후 재정제 과정을 거쳐야 하므로 공정의 경제성이 저하된다. 게다가 높은 효소 농도에서는 단백질-단백질 간의 상호작용으로 응집을 일으켜 생분해 반응 조건 최적화를 제한한다[20].

이러한 단점들은 효소를 세포 표면에 고정시킨 전세포 촉매(whole-cell catalyst)에 의해 극복될 수 있다. 전세포 촉매의 표면발현 시스템은 효모나 곰팡이, 박테리아 등 여러 세포들에 적용될 수 있고 최근에도 활발히 개발 및 응용되고 있다[21-24]. 전세포 촉매는 빠른 성장과 비교적 간단한 생산 절차로 시간을 단축시키고 비용을 절감시킨다. 또한 생산물과 촉매와의 분리가 쉽게 일어나므로 PET 분해 산물을 손쉽게 부가가치 제품으로 전환할 수 있게 하며 촉매의 재활용까지 가능하게 한다. 마지막으로 효소들이 고정되어 있으므로 효소 응집을 방지하게 되면서 대량 생산을 용이하게 해준다.

본 연구에서는 대장균 막단백질에 PETase를 융합한 전세포 촉매(*E. coli*-PETase)를 구축하였다. 대장균은 널리 사용되는 미생물 플랫폼으로 유전적 배경과 대사 과정들이 잘 연구되어 있으며 대규모 및 저비용 생산이 가능하므로 전세포 촉매 제조를 위한 속주로 적합하다[25]. 먼저, SDS-PAGE 및 유세포 분석을 통해 PETase의 대장균 표면 발현 및 고정화 여부를 분석하였다. 다양한 물리화학 조건에서 전세포 촉매의 PET 미세입자 분해 활성을 평가하고 반응조건을 최적화하였다. 활성 분석 시 해양 생태계에 치명적인 영향을 미치는 300 µm 이하의 PET 미세입자를 기질로 사용하여 해양 미세플라스틱 오염 문제 해결 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Western blot에서 사용된 1차 항체 Purified anti-His tag Antibody와 2차 항체 HRP Goat anti mouse IgG Antibody 및 FACS에서 사용된 Alexa Fluor 488 anti-His tag antibody는 BioLegend에서 구매하였다. 1-Step Ultra TMB Blotting Solution은 Thermo Scientific™에서 구매하였다. PET 입자 (≤300 µm)는 GoodFellow에서 PET 필름 (12 µm)은 UBIGEO에서 구매하였다. 기타 시약은 덕산약품에서 구매하였다.

2. 유전자 클로닝 및 형질전환

pQE-lpp-OmpA-PETase 발현벡터는 pQE80 (Qiagen) 벡터에 Lpp, OmpA, PETase 유전자가 연속으로 합성된 융합유전자를 제한효소로 클로닝하여 제조되었다. Lpp-OmpA-PETase 융합유전자의 전체 서열은 아래와 같고 Lpp, OmpA, PETase, His tag에 해당하는 서열을 각각 굵은 글씨, 밑줄 글씨, 이탤릭 글씨, 굵은 밑줄 글씨체로 구분하였다.

AAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAAT
CCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCCAG
CAACGCTAAAATCGATCAGGGAATTAACCCGT
ATGTTGGCTTTGAAATGGGTTACGACTGGTTAG
GTCGTATGCCGTACAAAGGCCAGCGTGAAAAC
GGTGCATACAAAGCTCAGGGCGTTCAACTGAC
CGCTAAACTGGGTTACCCAATCACTGACGACCT
GGACATCTACTCGTCTGGGTGGCATGGTATG
GCGTGCAGACACTAAATCCAACGTTTATGGTAA
AAACCACGACACCGGCGTTTCTCCGGTCTTCGC
TGGCGGTGTTGAGTACGCGATCACTCCTGAAAT
CGCTACCCGTCTGGAATACCAGTGGACCAACA
ACATCGGTGACGCACACACCATCGGCCTCGTC
CGGACAACGGCGGAGGTTCTGGAGGAGGGAGCC
AAACAAATCCTTATGCCCGTGGACCCAATCCGACG
GCTGCGTCTTTGGAAGCTAGTGCGGGTCCGTTCA
CCGTGCGTAGTTTACTGTCAGTAGACCTTCCGGG
TATGGCGCAGGGACTGTCTATTATCCCACAAATGC
TGGGGGCACTGTAGGTGCTATAGCAATAGTACCTG
GTTACACGGCGAGACAGAGTAGCATCAAATGGTG
GGGACCTCGTTTGGCATCGCACGGATTTCGTTGTTA

TCACAATAGACACAAATTCCACTCTGGACCAGCCG
 TCGTCGCGTTCATCTCAGCAGATGGCTGCACTTCG
 TCAAGTTGCATCCCTGAATGGCACAAGCAGTAGCC
 CTATATATGGTAAGGTCGACACTGCCCGGATGGGT
 GTTATGGGCTGGTCTATGGGTGGCGGCGGATCCT
 TAATTAGCGCTGCCAACAATCCATCGTTAAAGGCT
 GCCGCACCGCAGGCACCGTGGGATAGTTCTACCA
 ACTTCTCCTCGGTTACGGTACCGACGCTTATTTTC
 GCTTGCAGAAATGACAGCATTGCCCCAGTGAACA
 GCTCTGCCTTACCCATTACGATTCTATGAGCCGT
 AATGCGAAGCAGTTCCTGGAAATAAATGGCGGTAG
 CCATTCATGTGCTAATAGTGGGAATAGTAACCAAG
 CTCTTATCGGGAAGAAAGGCGTAGCGTGGATGAA
 GCGGTTTCATGGATAATGATACAAGATACTCGACCT
 TCGCGTGTGAGAACCCAAATTCCACACGTGTAAGC
 GATTTTCGTACAGCTAACTGTTTCATTAGAACACCA
TCATCATCATCAC

pQE-T7 발현백터는 pQE80의 T5 promoter/operator 서열이 T7 promoter/operator로 치환된 변종백터로서 본 연구를 위해 특정부위 돌연변이 유도 기법 (Site-directed mutagenesis)을 통해 제작되었다. pQE-T7-PETase 발현백터는 pQE-T7 백터에 His tag 을 포함한 PETase 유전자를 제한효소로 클로닝하여 제조되었다. 해당 유전자 서열은 상기 Lpp-OmpA-PETase 유전자 서열 중 이탤릭 글씨, 굵은 밑줄 글씨체와 동일하다. 일반적인 열충격법을 통해 pQE-Lpp-OmpA-PETase 또는 pQE-T7-PETase 로 형질전환된 SHuffle *E. coli*(NEB)은 각각 SHuffle-LOP 또는 SHuffle-P로 명명되었다.

3. 세포 배양 및 유도

형질전환 단일 균주를 100 µg/ml 농도의 암피실린 이 첨가된 LB 배지 4 ml에 접종하여 34°C, 200 rpm 조건 하에 16 h 동안 배양하였다. LB 배지 400 ml에 미리 배양해 둔 배지 4 ml를 접종하고 같은 조건에서 600 nm에서 흡광도값이 0.5에 도달하면 1 mM의 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하였다. SHuffle-P 균주 배양 시, IPTG 첨가 후 18°C, 200 rpm에서 50 h을 추가로 배양하고 4°C, 8,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 상등액은 단백질 정제 전까지 냉장보관하였다. SHuffle-LOP 균주 배양 시, IPTG 첨가 후 34°C, 200

rpm에서 2 h을 추가로 배양하고 4°C, 3,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리하여 세포 침전체를 수거하였다. 세포는 25%의 글리세롤이 포함된 PBS에 재분산시켰고 1.0 ml씩 소분하여 -80°C에서 냉동보관하였다.

4. PETase 정제

배양 후 얻은 상등액을 4°C, 12000 rpm에서 30 min 동안 원심분리하여 불순물을 제거한 후 감압여과를 통해 불순물을 추가로 한 번 더 제거하였다. 여과된 상등액에 Ni-NTA 아가로스 비드를 2 ml를 넣어주고 1 h동안 4°C에서 흔들어 반응시켰다. 폴리프로필렌 컬럼에 용액을 부어 비드 이외의 용액들을 흘려보내고 10 mM의 이미다졸이 포함된 PBS로 비드 사이의 불순물을 세척하였다. 세척이 끝난 컬럼에 250 nM의 이미다졸이 포함된 PBS를 1 ml씩 넣어 총 5 ml의 PETase 용액을 용출시켰다.

5. SDS-PAGE와 Western blot

SDS-PAGE와 Western blot에서 12% SDS-PAGE Gel이 사용되었다. *E. coli*-PETase는 OD_{600nm}값 0.1로 준비되었고 5×SDS-PAGE loading buffer (Biosesang)을 첨가하고 95°C에서 10 min 동안 끓인 후 10 µl씩 loading 하였고, 150 V로 85 min 간 전기영동 하였다. 전기 영동이 끝난 단백질은 staining buffer에서 염색되거나 Western blot이 진행되었다. 0.22 µm WestPure PVDF Membrane Sheet (GenDEPOT)에 300 mA로 60 min간 이행된 단백질은 5% skim milk가 첨가된 PBS에 2 h 동안 담가 불필요한 단백질의 부착을 억제하였다. 이를 다시 세척 용액 (0.05% Tween 20, PBS)으로 5 min 씩 3회 세척한 후 1차 항체 용액 (1:2000v/v in 0.05% Tween 20, PBS) 15 ml 로 2 h 동안 실온 반응시켰다. 1차 항체가 처리된 단백질을 세척 용액으로 5 min 씩 3회 세척한 후 2차 항체 용액 (1:2000v/v in 0.05% Tween 20, PBS) 15 ml 로 1 h 동안 실온 반응시켰다. 2차 항체까지 처리 완료된 단백질을 세척용액으로 10 min 씩 2회 세척한 후 substrate 1 ml를 넣고 반응시켰다.

6. Flow cytometry

냉동 보관된 *E. coli*-PETase를 4°C, 3000 g 에서 5 min 동안 원심분리하여 세포 침전체를 수거하였다.

세포 침전체를 PBS 1 ml에 재분산시키고 같은 조건에서 원심분리를 한 번 더 진행하여 세포를 세척하였다. 다시 PBS 1 ml에 재분산된 세포를 4×10^7 cells/ml가 되게끔 희석하였다. 세포 4×10^7 개에 Alexa 488 anti-His tag antibody가 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되게끔 처리하고 차광하여 4°C에서 30 min 동안 반응시켰다. 준비된 세포는 BD science사의 FACSVerse™로 각 실험 당 10,000 개씩 분석되었다.

7. 다양한 조건에서의 PET 분해

E. coli 표면에 발현된 PETase의 활성을 확인하기 위해 *E. coli*와 PETase를 대조군으로 설정하였다. Glycine-NaOH (pH 9.0), PBS (pH 7.0), 또는 Phosphate buffer (pH 4.0)에 PET 입자를 2.5 mg/ml 농도로 첨가하고 20, 30, 40, 또는 50°C의 항온수조에서 온도를 맞춰주었다. *E. coli*-PETase, *E. coli* 또는 PETase를 넣어 PET 분해 반응을 시작하였고 0, 10, 30, 60, 120, 360 min에 1 ml 씩 채취하였다. 샘플들은 채취되는 즉시 최종 농도 3 mM의 H_2SO_4 를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 샘플들은 13,500 rpm, 1 min의 원심분리를 통해 PET 입자와 분리되었고 254 nm에서의 상등액의 흡광도 값을 측정하였다[28].

8. *E. coli*-PETase 전세포 촉매의 재사용 및 주사전자 현미경 (Scanning Electron Microscopy, SEM) 분석

E. coli-PETase의 재사용 가능성을 확인하기 위해 두께가 12 마이크론인 PET 필름을 직경 0.6 mm의 원형으로 준비하였다. PET 필름은 20% 에탄올에서 1 h 동안 담가 세척한 후 건조되었다. Glycine-NaOH (pH 9.0) 20 ml에 PET 필름을 넣고 30°C의 항온수조에서 온도를 맞춰주었다. *E. coli*-PETase 1.6×10^8 cells/ml 농도로 첨가하고 PET 분해 반응이 시작된 지 360 min 후에 PET 필름을 꺼냄으로써 반응을 종료하였다. 5000 g, 5 min의 원심분리를 통해 반응 용액과 *E. coli*-PETase를 분리하였고 30°C의 Glycine-NaOH 20 ml에 재분산시킨 후 세포 수를 측정하였다. 새로운 PET 필름을 넣고 PET 분해 반응을 재개하였고 이와 같은 재사용성 확인 실험은 2회 더 반복되었다. SEM을 통한 표면 분석을 위해 반응이 완료된 PET 필름은 20% 에탄올에서 1 h 동안 담가 세척한 후 70% 에탄올에 적셔 자연건조시켰다.

결과 및 고찰

1. PETase의 박테리아 표면 발현

대장균(*E. coli*) 표면에 PETase를 고정하기 위해서 *E. coli* 외막 단백질(Lpp-OmpA)과 PETase를 유전자 융합하였다. Lpp-OmpA는 그람 음성 박테리아에서 재조합 단백질의 표면 표시(surface display)에 광범위하게 사용되는 키메라 단백질로 *E. coli* 표면의 지질단백질(Lipoprotein, Lpp)의 신호 펩타이드에서 유래하는 아미노산 서열 일부(아미노산 1-9)와 외막단백질 A(Outer membrane protein A, OmpA)를 구성하는 아미노산 일부(아미노산 67-180)가 융합된 형태이다[26, 27]. Anti-His tag 항체와 유세포 분석기를 이용한 Lpp-OmpA-PETase 융합 단백질의 표면 발현 여부를 확인하기 위해 Lpp-OmpA-PETase 융합 단백질의 C 말단에 His tag를 삽입하였다(Figure 2(a)). Lpp-OmpA-PETase의 발현은 IPTG를 통한 유도 전(before induction, BI)과 2 h 유도 후(after induction, AI)의 세포를 SDS-PAGE와 Western blot을 통해 확인하였다(Figure 2(b)). 약 45.0 kDa의 크기를 갖는 단백질이 발현되었고, 이는 44.8 kDa의 분자량을 갖는 Lpp-OmpA-PETase이다. PETase의 표면 고정 여부는 Alexa Fluor 488 anti-His tag 항체 처리 세포를 유세포 분석으로 확인하였다(Figure 2(c))(Table 1). 약 10,000 개의 세포들을 분석한 결과 *E. coli*-PETase의 평균형광세기(MFI)는 5,069이고 천연형 *E. coli*의 MFI는 71로 나타나 PETase가 표면 외부에 발현되었음을 확인하였다.

Table 1. Representative data of flow cytometry analysis

Name	Events	%Total	SSC-A Mean	FSC-A Mean	MFI
<i>E. coli</i>	9,832	98.32	18,559	18,608	71
<i>E. coli</i> -PETase	8,109	81.09	18,897	27,462	5,069

2. 다양한 조건에서의 PETase 전세포 촉매의 PET 분해 활성

PETase의 세포막 발현이 확인된 *E. coli*-PETase를 전세포 촉매로 활용하기 위해, 표면 발현된 PETase의 PET 분해 활성을 다양한 물리화학 조건에서 평가하였다. 모든 실험군에서 300 마이크론 직경의 PET 입자(기질)의 농도는 2.5%(w/v), 전세포 촉매 *E.*

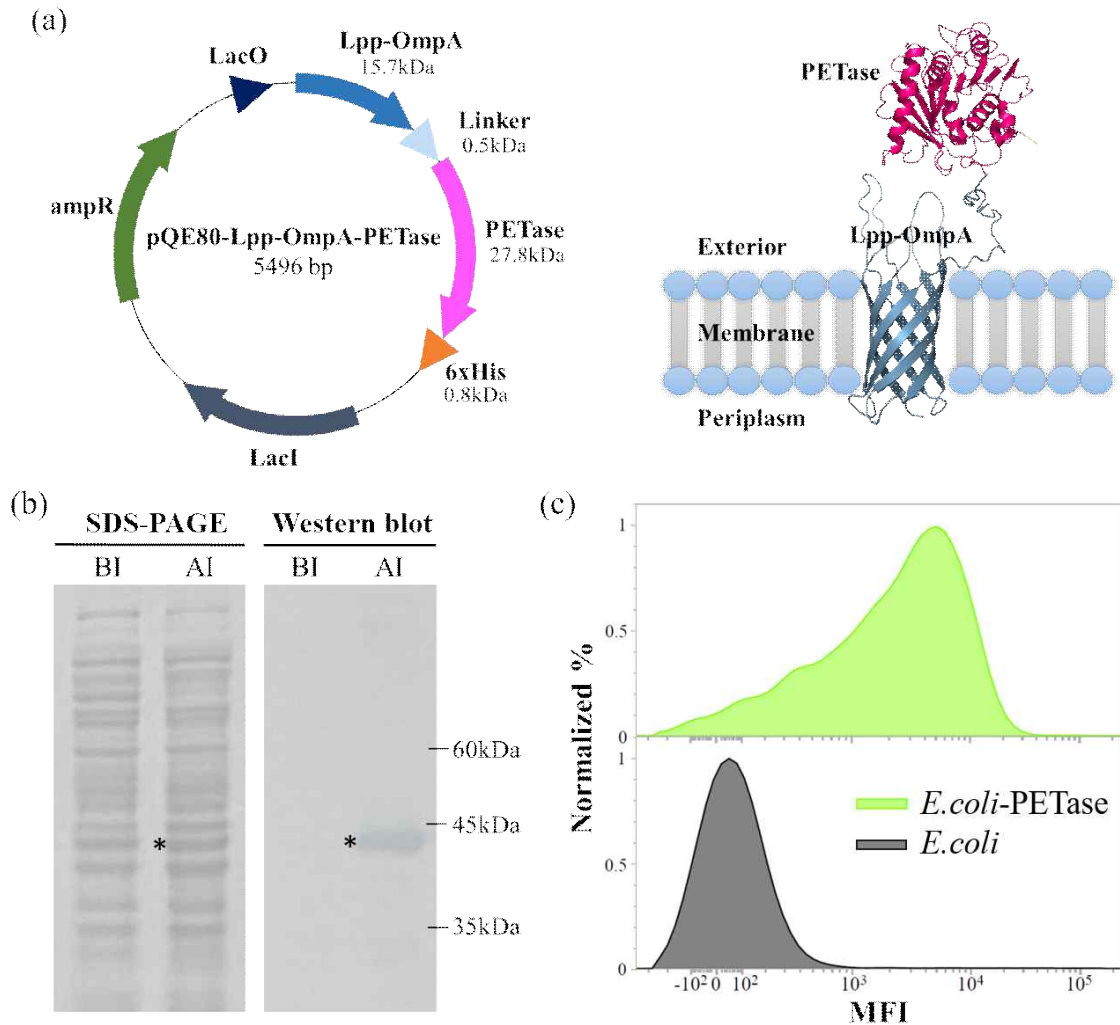


Figure 2. Bacterial surface expression of PETase. (a) Vector map of pQE80-Lpp-OmpA-PETase and schematic image of surface-expressed PETase in *E. coli*. (b) SDS-PAGE and Western blot analysis to detect Lpp-OmpA-PETase marked with a star. (c) Normalized cell count of the wild-type *E. coli* SHuffle (grey) or *E. coli*-PETase (green) treated with fluorescently labeled anti-His tag antibody to detect the surface-displayed PETase and the corresponding mean fluorescence intensity (MFI) levels by flow cytometry.

coli-PETase의 농도는 1.6×10^8 cells/ml로 동일하였다. PET의 분해산물인 BHET, MHET, TPA는 254 nm에서 최대 흡광도 값을 가지므로, 전세포 촉매 *E. coli*-PETase의 PET 분해 활성은 시간에 따른 254 nm 흡광도 값의 변화로 확인하였다. 흡광도 측정법을 사용하면 상대 효소 동역학을 간단하고 빠르게 확인할 수 있다[28].

먼저 pH에 따른 전세포 촉매 *E. coli*-PETase의 PET 분해 활성을 측정하였다. 반응 시작 후 4 h 경과 시 측정된 최종 흡광도는 pH 9에서 0.5, pH 7에서 0.19,

pH 4에서 0.09로 알칼리 조건에서 가장 높은 분해 활성을 보였다(Figure 3(a)). 다음으로, 알칼리 조건 (pH 9)에서 온도에 따른 PET 분해 활성을 측정하였다. 고온(40~50°C)에서 관찰된 전세포 촉매의 초기 반응속도 및 최종 흡광도는 상온(20°C)에서 관찰된 수치보다 우수하였으나 반응 시작 후 1 h 내에 PETase의 구조변형 또는 세포용해(lysis)에 기인하는 전세포 촉매 불활성화 현상이 관찰되었다(Figure 3(b)). 반면, 중온(30°C) 조건에서 전세포 촉매의 초기반응속도는 고온 반응 대비 낮았으나 PET 분해

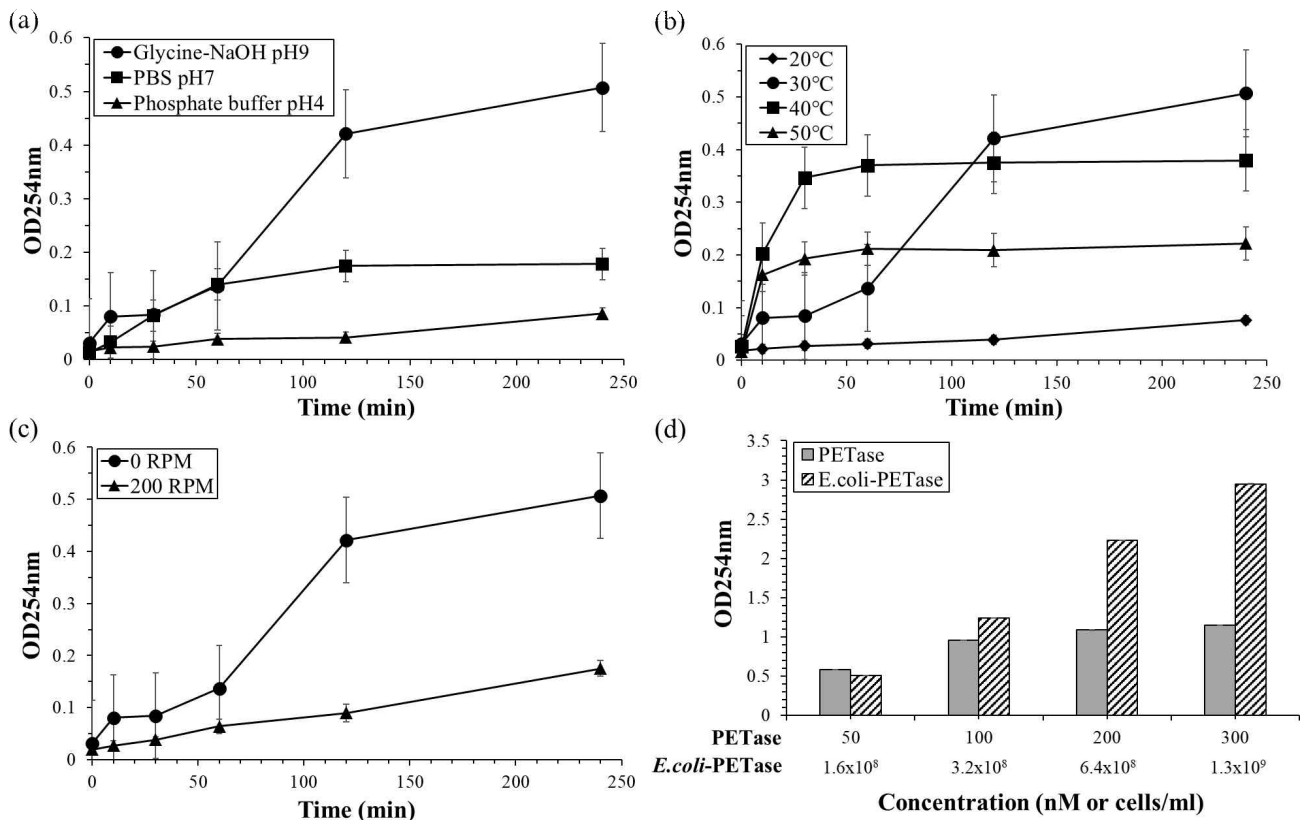


Figure 3. Optimization of the PET degradation by *E. coli*-PETase (a) pH-dependent catalytic activity of *E. coli*-PETase at 30°C. (b) Temperature dependent catalytic activity of *E. coli*-PETase at pH 9. (c) Catalytic activity of *E. coli*-PETase with or without shaking at pH 9, 30°C and (d) Concentration-dependent catalytic activity of PETase or *E. coli*-PETase without shaking at pH 9, 30°C. Error bars represent mean ± SD (n=3).

활성이 반응 시작 후 4 h 동안 또는 그 이상 유지되면서 가장 높은 최종 흡광도를 보였다. 위의 결과로부터 전세포 촉매의 최적 활성은 알칼리 수용액 및 중온(30°C)에서 확보될 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한 해당 조건은 Yoshida 그룹에서 발표한 천연형 PETase의 최적 반응 조건인 pH 9, 30°C와 동일하므로, PETase가 *E. coli* 세포막 표면에 고정되더라도 천연형 PETase에 비견되는 구조 및 기능을 보인다고 할 수 있다[17]. 천연형 PETase의 구조적 열안정성 연구에서 보고한 T_m 값은 48.81°C이며, 이로부터 고온(40~50°C)에서 관찰된 전세포 촉매의 빠른 불활성화는 PETase의 열변성에 기인함을 유추할 수 있다 [18].

다음으로 최적화 조건(pH 9, 30°C)에서 전세포 촉매 반응액의 진탕 여부에 따른 PET 분해 활성 차이를 평가하였다. 최종 흡광도로 평가한 상대적 분해

활성은 200 rpm 조건 대비 0 rpm에서 3배 이상 높게 관찰되었다(Figure 3(c)). 진탕 조건에서 기질의 효소 활성 부위로의 확산이 촉진됨에 따라 효소의 반응성(catalytic activity)은 일반적으로 증가한다. 그러나 PET 같은 거대분자(macromolecule)가 기질로 작용할 경우, 입체 장애(steric hindrance)로 인해 효소작용 부위로의 효소 접근이 방해받게 된다. 이때 효소 반응성은 기질의 확산 촉진보다는 거대기질 내 작용부위 효소국소농도(local concentration) 및 작용부위 국소접촉시간(local contact time)에 더 의존할 것으로 보인다. 본 연구에 사용된 기질은 수백 마이크론의 직경을 지닌 PET 입자로서 5 nm 크기에 불과한 PETase 보다 만 배 이상 크고 비정질(amorphous) 및 결정질(crystalline) 고분자 구조가 혼재되어 효소 접근성이 낮다. 또한 PET 입자는 비수용성 고분자이므로 비진탕 조건에서 용기 바닥에 침착된다. 이러한

기질 특성으로 인해 전세포 촉매의 반응성은 효소 작용부위의 효소국소농도 및 작용부위 국소접촉시간이 확보되는 비진탕(PET입자 침착) 조건에서 높게 나타난 것으로 보인다.

천연형 PETase의 직접 사용과 비교할 때 전세포 촉매 형태의 PETase를 사용함으로써 효소 구조의 안정성 증가로 인한 최적 반응조건 탐색 범위의 확장을 기대할 수 있다. 기존 연구에 따르면 PETase는 100 nM 이상의 농도에서 응집을 일으켜 PET 분해 반응성이 효소 농도에 비례하지 못하고 포화되는 경향성을 보인다[17]. 반면, 세포막 표면에 PETase를 고정시킨 전세포 촉매는 PETase의 자유 분자 확산을 억제하고 독립적 구조 안정성을 향상시켜 PETase 응집으로 인한 반응성 제한을 극복할 것으로 예상하였다. 이를 증명하기 위해 50 nM PETase와 1.6×10^8 cells/ml *E. coli*-PETase 전세포 촉매의 PET 분해 조건을 기준으로 PETase 또는 전세포 촉매 농도를 점진적으로 증가시켰을 때 관찰되는 PET 입자 반응효율을 4 h 반응 후 최종 흡광도로 비교하였다(Figure 3(d)). PETase는 100 nM 이상의 농도에서 반응성의 증가폭이 둔화되며 정체되었다. 그러나 *E. coli*-PETase 전세포 촉매를 사용할 경우 농도와 반응성이 비례 관계로 증가하였으며, 이는 PETase의 세포막 고정화에 따른 PETase 구조 안정성 증가에 기인하는 것으로 보인다. 이러한 결과는 고농도 전세포 촉매를 활용한 PET 분해 반응 구현 및 추가적인

반응조건 최적화 가능성을 제시한다.

3. 전세포 촉매의 재사용성

촉매의 재사용성(reusability)은 공정의 단가 효율을 결정하는 중요한 요소이다. 앞서 탐색한 전세포 촉매의 PET 분해 활성 최적화 조건에서 전세포 촉매의 재사용성을 평가하였다. 본 평가에서는 전세포 촉매, 기질, 생산물(product)이 용이하게 분리될 수 있도록 PET 입자 대신 PET 필름을 기질로 사용하였다. 1차 PET 분해반응을 수행한 전세포 촉매는 즉시 원심분리를 통해 회수된 후 새로운 반응액에 재분산되어 2차 분해반응을 수행하였다. 그 결과 전세포 촉매의 반응성은 2차까지 그대로 유지되고 3차에서도 55%의 반응성을 나타내어 전세포 촉매의 재사용성이 입증되었다(Figure 4(a)).

전세포 촉매에 의한 PET 필름 표면 형태 변화를 SEM으로 관찰하였다. 전세포 촉매 없는 완충액에 보관된 PET 필름 음성대조군(Figure 4(b))과는 대조적으로 3차 반응이 완료된 PET 필름의 표면에는 균열 및 부식에 의한 형태 변화가 있었다(Figure 4(c)). 이는 PET 필름의 표면에서 전세포 촉매에 의한 PET 분해가 진행되었음을 시사한다[29]. 4차 이상의 재사용성을 확보를 목표로 전세포 촉매의 안정성과 회수율을 높이는 추가적인 연구가 수행된다면 실용화를 위한 비용 면에서 효율적인 처리 기술을 개발하는 데에 유리할 것이다.

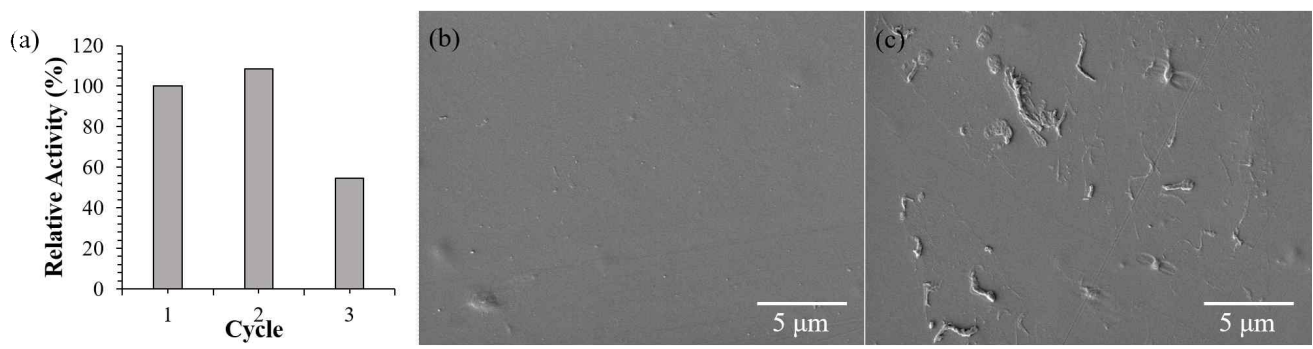


Figure 4. (a) Reusability test of the *E. coli*-PETase. The relative activity of each cycle of the reaction was normalized to the catalytic activity of the first cycle (n=2). The catalytic activity was measured by the end-point (4 h post-initiation) absorbance at 254 nm divided by the cell density. SEM image of PET film after 12 h incubation without whole-cell catalyst (b) or with whole-cell catalyst (c).

결 론

본 연구에서는 PET에 대한 높은 분해활성을 지닌 가수분해 효소 PETase를 표면 발현한 *E. coli*를 전세포 촉매로 활용하기 위한 가능성을 조사하였다. *E. coli* 외막 단백질인 Lpp-OmpA의 C 말단에 PETase를 융합함으로써 세포 표면에 표시하였고 Western blot 및 유세포 분석을 통해 PETase가 세포 외막에 발현되어 있음을 확인하였다. 발현 여부 확인 후 전세포 촉매로서의 활성 및 재활용성을 평가하기 위해 다양한 조건에서 전세포 촉매의 PET 입자 또는 필름 분해능을 측정하였다. 전세포 촉매는 천연형 PETase의 활성 연구 보고에서와 동일하게 [17] pH 9, 30°C의 조건에서 제일 높은 활성을 보였다. 진탕 조건 또는 비진탕 조건에서 전세포 촉매의 활성을 비교하였을 때, 비진탕 조건에서 침전된 PET 입자와 전세포 촉매 간의 접촉 시간이 늘어나 활성이 3배 이상 더 높게 측정되었다. 천연 PETase와의 활성 비교를 통해 PETase를 세포 표면에 고정함으로써 효소의 응집을 방지하여 더 효율적인 분해가 가능함을 증명하였다. 전세포 촉매의 재사용 실험에서는 2차까지는 반응성이 유지되었고 3차에서 55%로 줄어들어 전세포 촉매의 재활용 잠재성을 시사하였다. 본 연구에서 제시하는 전세포 촉매는 열분해 PET 처리 기술과는 차별되는 친환경적인 PET 분해제로서 의의가 있다. 열적 안정성 및 분해 능력이 뛰어난 PETase 변이체를 적용하거나 세포의 안정적으로 회수하도록 연구를 진행한다면 활성 및 재활용성을 개선할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 연구는 2022년 부경대학교 국립대학육성사업 지원비와 2020년도 강릉원주대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 수행되었음.

References

1. Industry Research. 2019. <https://www.industryresearch.biz/global-poly-ethylene-terephthalate-pet-market-13877644>
2. Bartolome L, Imran M, Cho BG, Al-Masry WA, Kim DH. 2012. Recent developments in the chemical recycling of PET. *Material recycling-trends and perspectives* 406:576-596.
3. Chatterjee S, Kumari S, Rath S, Das S. 2022. Chapter 1 - Prospects and scope of microbial bioremediation for the restoration of the contaminated sites. In: Das S, Dash HR, editors. *Microbial Biodegradation and Bioremediation (Second Edition)*: Elsevier. p. 3-31.
4. Cressey D. 2016. Bottles, bags, ropes and tooth-brushes: the struggle to track ocean plastics. *Nature* 536:263-265.
5. Crippa M, Morico B. 2020. PET depolymerization: a novel process for plastic waste chemical recycling. In: *Studies in Surface Science and Catalysis*: Elsevier. p. 215-229.
6. Dong X, Ji J, Zhang S, Peng D, Wang Y, Zhang L, Li J, Wang G. 2022. Study on a Low-temperature Cellulose-degrading Strain: Fermentation Optimization, Straw Degradation, and the Effect of Fermentation Broth on Seed Growth. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 27:652-667.
7. Earhart CF. 2000. Use of an Lpp-OmpA fusion vehicle for bacterial surface display. *Methods Enzymol* 326.
8. Fasehee H, Rostami A, Ramezani F, Ahmadian G. 2018. Engineering *E. coli* cell surface in order to develop a one-step purification method for recombinant proteins. *AMB Express* 8:107.
9. Iñiguez ME, Conesa JA, Fullana A. 2016. Marine debris occurrence and treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 64:394-402.
10. Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Law KL. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347:768-771.
11. Kedzierski M, D'Almeida M, Magueresse A, Le Grand A, Duval H, César G, Sire O, Bruzard S, Le

- Tilly V. 2018. Threat of plastic ageing in marine environment. Adsorption/desorption of micropollutants. *Marine Pollution Bulletin* 127:684–694.
12. Kim D, Kim W, Kim J. 2021. New bacterial surface display system development and application based on *Bacillus subtilis* YuaB biofilm component as an anchoring motif. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 26:39–46.
 13. Lee W, Park Y–T, Lim S, Yeom SH, Jeon C, Lee H–S, Yeon YJ. 2021. Efficient Production of Phenyllactic Acid by Whole–cell Biocatalysis with Cofactor Regeneration System. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 26:402–407.
 14. Mendenhall E. 2018. Oceans of plastic: A research agenda to propel policy development. *Marine Policy* 96:291–298.
 15. Rao B, Zhou R, Dong Q, Liao X, Liu F, Chen W, Liu X, Min Y, Wang Y. 2020. Efficient surface display of L–glutamate oxidase and L–amino acid oxidase on *Pichia pastoris* using multi–copy expression strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 25:571–579.
 16. Shirke AN, White C, Englaender JA, Zwarycz A, Butterfoss GL, Linhardt RJ, Gross RA. 2018. Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with Glycosylation: Mechanism and Effect on PET Hydrolysis. *Biochemistry* 57:1190–1200.
 17. Shojaei B, Abtahi M, Najafi M. 2020. Chemical recycling of PET: A stepping-stone toward sustainability. *Polymers for Advanced Technologies* 31:2912–2938.
 18. Son HF, Cho IJ, Joo S, Seo H, Sagong H–Y, Choi SY, Lee SY, Kim K–J. 2019. Rational Protein Engineering of Thermo–Stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for Highly Efficient PET Degradation. *ACS Catalysis* 9:3519–3526.
 19. Son HF, Joo S, Seo H, Sagong HY, Lee SH, Hong H, Kim KJ. 2020. Structural bioinformatics–based protein engineering of thermo–stable PETase from *Ideonella sakaiensis*. *Enzyme Microb Technol* 141:109656.
 20. Taniguchi I, Yoshida S, Hiraga K, Miyamoto K, Kimura Y, Oda K. 2019. Biodegradation of PET: current status and application aspects. *ACS Catal.* 9.
 21. Urbar–Ulloa J, Montaña–Silva P, Ramírez–Pelayo AS, Fernández–Castillo E, Amaya–Delgado L, Rodríguez–Garay B, Verdín J. 2019. Cell surface display of proteins on filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:6949–6972.
 22. Wang P, Cui T, Yang Y, Li J, Su Y, Liu N, Hong M. 2022. Degradation of 1, 4–dioxane by Newly Isolated *Acinetobacter* sp. M21 with Molasses as the Auxiliary Substrate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 27:423–431.
 23. Wei R, Tiso T, Bertling J, O’Connor K, Blank LM, Bornscheuer UT. 2020. Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling. *Nature Catalysis* 3:867–871.
 24. Welle F. 2011. Twenty years of PET bottle to bottle recycling—an overview. *Resour Conserv Recycl* 55.
 25. Ye M, Ye Y, Du Z, Chen G. 2021. Cell–surface engineering of yeasts for whole–cell biocatalysts. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44:1003–1019.
 26. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, Toyohara K, Miyamoto K, Kimura Y, Oda K. 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351.
 27. Zhang F, Zhao Y, Wang D, Yan M, Zhang J, Zhang P, Ding T, Chen L, Chen C. 2021. Current technologies for plastic waste treatment: A review. *Journal of Cleaner Production* 282:124523.
 28. Zhong–Johnson E, Voigt C, Sinskey A. 2021. An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly(ethylene terephthalate) films. *Scientific Reports* 11.
 29. Shi L, Liu H, Gao S, Weng Y, Zhu L. 2021. Enhanced Extracellular Production of IsPETase in *Escherichia coli* via Engineering of the pelB Signal Peptide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69:2245–2252.