Fe_3O_4 자성나노입자를 이용한 재조합 levansucrase의 고정과 Levan의 생합성

노현정*, 안현호*, 권호찬*, 이수환**, 이우일*
*건양대학교 의료신소재학과, **건양대학교 제약생명공학과
e-mail: lee0519@konyang.ac.kr

Immobilization of recombinant levansucrase using Fe_3O_4 magnetic nanoparticles and biosynthesis of Levan

Hyeon-Jeong Noh*, Hyun-Ho AN*, Ho-Chan Kwon*, Su-Hwan Lee**, Woo-Yiel Lee*
*Dept. of Biomedical Materials, Konyang University,
**Dept.of Pharmaceutics & Biotechnology, , Konyang University

요 약

본 연구는 *E.coli*에서 발현되는 *Bacillus subtilis* 유래의 levansucrase를 Fe_3O_4 자성나노입자(MNPs)의 표면에 고정하였다. MNPs는 공침법에 의해 간단히 합성되었으며, APTES를 이용해 표면을 아미노기로 개질하였다. SEM, VSM, XRD을 이용하여 특성화한 MNPs는 20 nm 정도 크기의 매끄러운 구형을 이루고 있으며, 초상자성체의 거동을 하였다. 고정된 levansucrase는 FT-IR을 이용하여 결합을 확인하였으며, 열안정성의 증가가 확인되었다. 고정화된 levansucrase는 5회 재사용 후에도 초기 활성의 60.6 %의 활성을 가지고 있어 생산 공정과 단가의 절감 측면에서 매우 경제적인 방법이라 할 수 있다.

1. 서론

Levan은 β-2,6 glycoside 결합으로 이루어진 수용성의 천연 fructan으로, 낮은 고유 점도와 높은 접착 강도, 겔화 능력을 가져 다양한 산업의 소비재로서 잠재력이 확인되었다. 그럼에도 불구하고 levan의 상업적인 이용은 대량 알코올 처리와 효소 억제와 같은 다운스트림 프로세스의 병목 현상으로 인해 규모 확대가 저해되어 극히 일부에 불과하다[1].

*B. subtilis*에서 유래된 levansucrase는 52,971 Da의 질량과 473개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 이중 29까지의 아미노산은 signal peptide로 세포외 분비에 관여한다. 많은 levan 형성 미생물들은 가수분해 효소인 levanase를 동시에 생산하며, levansucrase 자체도 특정 조건 하에서 가수분해를 일으키는 것으로 여겨진다. 이는 고분자량의 levan을 얻기에는 매우 불리한 조건으로, 유전자 재조합 기술을 통해 *E. coli*에서의 단백질 발현이 많이 연구되고 있다. 또한, 단백질을 세포질 막의 단백질 송출 시스템으로 보내는 짧은 아미노산인 signal peptide는 *E.coli*에서 발생되는 문제인 불용성 봉입체를 방지할 수 있으며, 후속 정제 및 다운스트림 처리 단계를 줄여 전체 생산 비용을 획기적으로 감소시킬 수 있다[2].

산업적 응용을 위해 효소와 같은 생체 촉매를 불활성 지지체에 고정하는 것은 최종 생성물의 분리 및 정제와 생체 촉매 재사용을 촉진할 수 있다는 큰 이점을 제공한다. 지지체로서의 자성나노입자(MNPs)는 자성을 이용하여 간단히 선택적인 회수가 가능한 생체친화성 흡착제로, 광범위한 분자량과 낮은 독성으로 효소 고정화 뿐만 아니라 많은 산업 분야에서 무기 지지체로 이용되고 있다[3].

본 연구는 *B.subtilis*의 gDNA로부터 signal peptide가 포함된 Levansucrase 유전자(*sacB*)를 획득하여 levansucrase의 세포 외 발현을 유도하였다. 공침법을 이용하여 간단히 합성된 Fe_3O_4 MNPs는 3-aminopropylethoxysilane(APTES)로 표면을 아미노기로 개질하였으며, glutaraldehyde(GA)를 가교제로 하여 재조합 levansucrase의 고정을 위한 지지체로 사용되었다. FT-IR과 SEM, XRD, VSM을 사용하여 형태와 물성을 분석하고 효소의 활성과 열 안정성 및 재사용성을 평가하였다.

2. 실험 방법

2.1 재료

Cloning은 *B. subtilis*의 gDNA를 이용하여 pRSET_A vector (Thermo Fisher, USA)에 도입 후 *E. coli* BL21 (DE3) (iNtRON, Republic of Korea)을 통해 발현을 진행하였다. levan 합성의 기질로 사용된 sucrose와 자성나노입자를 합성하기 위한 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, APTES, GA는

모두 Sigm-aldrich에서 구매하였다. 합성된 Fe_3O_4 MNPs의 구조 분석은 ALPHA-P 분광광도계(Bruker, USA)를 이용하여 FT-IR스펙트럼을 얻었으며, Libra 200 MC TEM (Carl Zeiss, Germany)와 Apreo 2 SEM(Thermo Fisher, USA)를 이용하여 진행하였다. 그 외 본 실험에서 사용한 다른 화학 물질은 모두 분석 등급의 순수한 물질을 사용하였다.

2.2 Levansucrase의 cloning과 발현 및 정제

Levansucrase의 유전자(sacB)는 B.subtilis의 gDNA를 주형으로 하여, 정제의 용이성을 위해 6X his tag 부위를 추가하여 정방향 및 역방향 primer를 각각 pF: 5' -GGAATTCCATATGATGAACATCAAAAAGTTTGCA-3' 와 pR: 5' -CATGCCATGGTTAATGATGATGATGATGATGTTCCAGCGCTGCGGCTTTGTTAACTGTTAATTGTCC-3 로 설계하여 PCR을 통해 증폭하였다. 증폭된 sacB는 제한 효소인 Nde I 과 Nco I 을 이용하여 pRSET_A과 함께 처리한 후 25 ℃에서 1시간 동안 반응시켜 재조합 벡터 pRSLevB_His를 제조하였다. Levansucrase의 발현은 *E.coli* BL21(DE3)에 도입한 형질전환체를 ampiciiiin이 포함된 LB 배지에서 $O.D_{600}$이 0.6에 도달할 때까지 175 rpm, 37 ℃에서 배양하였으며, 1.0 mM의 IPTG를 첨가한 후 6시간동안 배양하였다. 발현된 단백질은 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제하였다.

2.3 아민 작용기가 도입된 Fe_3O_4 MNPs의 합성

$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (1g)와 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (2 g)을 100 mL의 증류수에 용해한 후, pH가 12에 도달할 때까지 NaOH (25 ~ 30 wt.%)를 반응혼합물에 첨가하였다. 용액을 90 ℃에서 30분간 교반 후 28 ℃까지 식힌 흑색 침전물을 50 % ethanol로 pH가 7이 될 때까지 세척하였다. 생성된 침전물은 진공오븐에서 건조하였다. 이후, Fe3O4 MNPs 1.25 g을 50 % ethanol 50 mL에 분산시켜 APTES 용액 5 mL를 첨가한 후 50 ℃에서 3시간동안 교반하였다. 용액은 원심분리 하였고, 수집한 pellet은 증류수를 이용하여 5회 세척한 후 건조하였다.

2.4 Fe_3O_4 MNPs를 이용한 levansucrase의 고정화

Fe_3O_4 MNPs는 PBS buffer에 용해시켜 농도가 50 mg/ML가 되도록 한 후 초음파 처리하였다. 이후 30 mM의 GA 용액을 첨가하여 30분 동안 교반한 후 Fe_3O_4@APTES-GA는 자석으로 수집하여 PBS buffer로 세 번 세척하였다. 수집된 MNPs와 levansucrase 침전물의 비율은 3:1 (W/W)로 첨가하여 3시간 동안 고정화 반응을 진행하였다.

2.5 고정화 levansucrase의 특성화

합성된 MNPs와 MNPs@Levansucrase의 형태는 Transmission electron microscopy(TEM)과 Scanning electron microscope(SEM)을 이용하여 특성화하였다. 회절계를 이용하여 Fe_3O_4와 효소 고정화된 Fe_3O_4의 X-ray diffraction(XRD) 패턴을 확인하였으며, MNPs의 표면에 amine과 levansucrase의 존재를 입증하기 위해 400-4,000 cm^{-1}범위의 파장에서 Fourier transform infrared(FT-IR) spectrum을 확인하였다. 합성된 Fe_3O_4 MNPs의 자기적 성질 세기는 Vibration sample magnetometer(VSM)로 확인하였다.

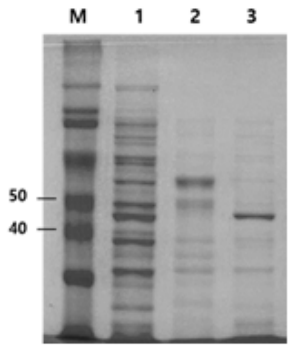
고정화된 levansucrase의 생체촉매로써의 최적 온도 조건을 20 mM Acetate buffer에서 20~50 ℃의 온도 변화 하에서 탐색하였다. 최적 조건에서의 활성을 100 %로 정의하고, 다른 조건에서의 상대적 활성을 계산하였다. 최적 pH 조건 시험은 pH 4.0~8.0으로 반응을 진행하였다.

재사용성에 대한 활성 시험은 7회에 걸쳐 진행되었으며, 각 사이클 후에 MNPs@Levansucrase를 자석을 이용하여 회수 및 현탁하고, 효소의 잔류 활성을 측정하여 첫 번째 주기의 효소 활성을 100 %로 설정하였다.

3. 실험 결과

3.1 재조합 levansucrase의 발현과 정제

gDNA로부터 PCR을 통해 성공적으로 signal peptide와 6X his tag를 가진 sacB를 획득하였으며, pRSET_A vector에 삽입하여 발현 벡터 pRSLevB_His를 구축하였다. BL21(DE3)에 도입하여 37 ℃에서 6시간 동안 배양을 통해 발현된 levansucrase의 배양액을 Ni-NTA를 이용해 정제한 후 각 단계에서 용출된 단백질을 SDS-PAGE로 발현 양상을 분석하였다. 그 결과 [그림 1]의 50 kDa 부근에서 확인된 단일 band로 성공적인 재조합 levansucrase의 정제를 확인하였다.



[그림 1] Ni-NTA를 이용한 재조합 levansucrase의 정제 분획물의 SDS-PAGE 결과. M: 단백질 marker, lane 1: pRSLevBHis/BL21(DE3) 배양액, lane 2: 세척을 통한 비결합된 단백질, lane 3: 250mM의 imidazole로 용리된 재조합 levansucrase.

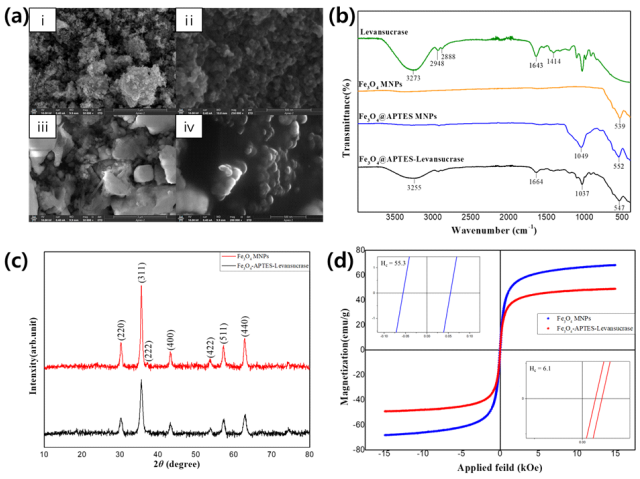
3.2 합성된 Fe3O4 MNPs의 특성화

합성된 Fe_3O_4 MNPs는 60 ℃에서 밤새 진공 건조 후 SEM으로 표면 형태를 확인하였다(그림 2a). 측정 결과 APTES로 표면을 코팅한 전, 후 모두 매끄러운 구형의 기하학을 보유하고 있었으며, 입자 내의 자기 쌍극자 모멘트로 인해 응집된 형태로 보였다.

재조합 levansucrase가 GA를 이용한 가교 방법으로 고정화된 MNPs는 60 ℃, −10 mmHg에서 밤새 진공 건조 후 FT-IR을 이용하여 고정 여부를 확인하였다(그림 2b). 순수한 MNPs는 545 cm^{-1}에서 Fe-O-Fe결합의 진동에 기인한 peak를 보였으며, 1049 cm^{-1}에서 보이는 Si-O-Si peak를 통해 APTES에 의한 표면 개질이 검증된다. 자유 levansucrase의 FT-IR peak와 비교하여, 고정화 된 MNPs의 spectrum에서 보이는 1414 cm^{-1}의 -COO-peak와 1643, 1664 cm^{-1}의 -NH peak를 통해 성공적인 효소 고정을 확인하였다.

합성된 MNPs의 결정 구조를 X선 회절법(XRD)으로 분석하여 Fe_3O_4와 효소가 고정된 Fe_3O_4 MNPs의 X선회절 패턴을 나타내었다(그림 2c). 대표적인 6개의 peak(220, 311, 400, 422, 511, 440)은 불순물이 없는 Fe_3O_4 MNPs의 성공적인 합성을 나타내며, 고정화 후에도 Bragg 회절 강도의 작은 차이를 제외하고는 유사한 패턴을 보였다.

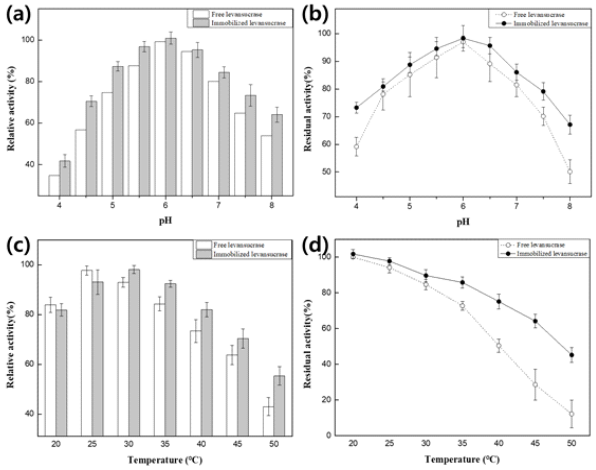
고정화 전, 후의 MNPs의 자기적 특성은 VSM을 이용하여 분석하였다(그림 2d). 자기장을 인가한 후 MNPs와 효소가 고정된 MNPs의 포화자화는 각각 68.1, 49.1 emu/g으로, 효소가 고정된 후 포화자화값이 소폭 감소하였여나 자기장에 충분히 반응하여 용이한 분리가 가능하였다.



[그림 2] levansucrase의 고정 전, 후의 합성된 Fe_3O_4 MNPs의 특성화. (a) Fe_3O_4 MNPs와 APTES로 표면 개질된 Fe_3O_4의 SEM 이미지, (b) 효소 고정 단계별 Fe_3O_4 MNPs의 FT-IR spectrum, (c) 고정 전 후 MNPs의 결정화도 확인을 위한 XRD 패턴, (d) 자기특성 확인을 위한 VSM hysteresis curve.

3.3 고정된 levansucrase의 생체촉매 특성

고정화 효소의 생체촉매로서의 활성에 대한 최적 pH는 자유효소의 적정 반응 pH를 변경하지 않고 동일하게 pH 6에서 최적의 활성을 나타내었으며(그림 3a), pH 안정성에 대하여 고정화 효소가 전체 pH 범위에서 조금 더 안정한 거동을 하였다(그림 3b). 고정화 후 levansucrasem이 최적 온도는 25 ℃에서 30℃로 이동하였는데(그림 3c), 이는 고정화 후 효소가 기질에 결합하기 위한 최적의 구조를 재구성하기 위한 활성화 에너지의 증가로 인해 보이는 거동이라 할 수 있다. 열 안정성에 대하여 고정된 효소는 40-50 ℃ 범위에서 초기 활성의 75~45 %의 활성을 유지하였으며, 이는 지지체와 효소 사이의 공유 결합으로 인해 단백질 변성이 방지됨에 기인한 결과로 볼 수 있다.



[그림 3] 고정화 levansucrase의 활성을 위한 (a) 최적 pH, (b) pH 안정성, (c) 최적 온도, (d) 열 안정성에 대한 상대적 활성 비교.

3.4 고정된 levansucrase의 재사용성

효소 고정의 궁극적 목적 이라 볼 수 있는 재사용성은 7회 반복 사용 후 잔류 활성을 분석하여 확인하였으며, 그 결과 고정된 levansucrase는 5주기에서 초기 활성의 60.6 %의 활성을 보였으며, 6주기와 7주기에서 각각 48.6, 21.3 %의 잔류 활성을 보였다.

4. 실험 결과

본 연구는 기능성 바이오소재인 levan의 합성 공정의 문제점을 해결하기 위해 signal peptide가 포함된 levansucrase를 무기 지지체인 Fe_3O_4@APTES MNPs에 고정함으로써 효소 안정성의 향상과 손쉬운 회수 후 재사용 특성을 부여하였다. 고정화된 levansucrase는 levan 합성을 위한 작동 조건에서 pH와 온도에 각각 변수를 주어 최적 조건과 안정성이 확인되었으며, 고정화된 levansucrase는 유리 효소의 반응

최적 pH를 변화시키지 않고 전체적으로 조금 더 안정한 거동을 보이고, 열 안정성의 증가를 보였다. 7회 반복 사용 후 잔류 활성을 이용하여 분석된 고정화 levansucrase의 재사용성은 5 주기에서 초기 활성의 60.6 %의 활성을 보였으며 재조합 levansucrase를 GA를 이용하여 Fe_3O_4 자성나노입자 효소 복합체는 levan 합성 산업에 있어 효율적인 공정일 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 정부(산업통상자원부)의 재원으로 한국산업기술진흥원의 '바이오융복합기술 전문인력 양성사업'의 지원을 받아 수행된 연구임(No. P0017805)

참고문헌

[1] Öner, Ebru Toksoy, Lázaro Hernández, and Joan Combie. "Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects." Biotechnology advances 34.5 (2016): 827-844.

[2] Shih, Lung, Li-Dar Chen, and Jane-Yii Wu. "Levan production using Bacillus subtilis natto cells immobilized on alginate." Carbohydrate Polymers 82.1 (2010): 111-117.

[3] Maciel, J. C., et al. "Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization." Journal of magnetism and magnetic materials 324.7 (2012): 1312-1316.