

특집: 효소 및 생물전환(III)

Trehalose-forming enzyme(트리할로스 생성효소)

김 철 호

동국대학교 한의과대학 생화학교실

중요성 및 범위

Trehalose(α , α -trehalose)는 세균, 곰팡이, 효모, 식물, 곤충, 동물등 널리 자연계에 존재하며, 설탕의 약 반정도의 감미도를 가지는 비환원성 2당류로서 열이나 산에 안정하며 동시에 단백질이나 세포를 동결시 또는 건조시 보호하는 기능을 가진다. 또한, 감미료, 청량음료, 냉동식품, 건조식품 그리고 의약품, 의약품 보존안정제 등 여러 가지 용도를 가지고 있다. 종래 Trehalose의 일반적인 생산법은 효모 균체에 있는 것을 추출하는 방법, 아미노산 발효 미생물 의한 발효 생산등이 있다. Trehalose의 생합성은 glucose-6-phosphate와 UDP- 또는 GDP-glucose에서 Trehalose-6-phosphate를 합성하는 Trehalose-6-phosphate synthetase, Trehalose-6-phosphate에서 Trehalose를 생성하는 Trehalose-6-phosphate phosphatase의 2개 효소가 관여하는 것으로 알려져 있었다. 또한 효소 반응에 의한 방법으로는 maltose phosphorylase와 Trehalose phosphorylase에 의해 maltose부터 생성하는 방법, sucrose phosphorylase와 Trehalose phosphorylase에 의해 sucrose와 glucose에서 생성하는 방법, Trehalase의 축합 반응을 이용한 glucose에서 생성하는 방법등이 있으나 수율, 제조 공정, 효소 조제등 여러 문제점이 있어 Trehalose를 싸게 생산하기가 곤란하였다. 그러나 최근, 토양 미생물로부터 Trehalose를 생성하는 효소가 발견되어, 반응으로 전분 부분 분해물에 작용하여 말단에 Trehalose구조를 갖는 비환원 당질을 생성하는 효소(Maltoiligosyl Trehalose Synthase; MTSase)와 비환원 당질로부터 특이적으로 Trehalose를 유리하는 효소(Maltoiligosyl Trehalose Trehalohydase; MTHase) 등이 발견되어 전분 부분 분해물로부터 Trehalose를 연속적으로 생성하게 되었다[1, 2].

한편, 내열성 고세균인 *Sulfolobus solfataricus* KM1[3]의 경우 다른 기작으로 α -trehalose를 생성시킨다. 즉, α -1,4glucan을 기질로 환원 말단에 있는 포도당 잔기가 α -1,1 결합당으로 전환하는 glycosyltransferase와 이 glycosyltransferase 작용으로 생성하는 glycosyltrehalose에서 trehalose 부분을 특이적으로 절단하는 α -amylase등 2가지 효소가 관여하고 있다.

최근에는, maltose로부터 trehalose을 직접 생성하는 미생물 효소중 trehalose synthase가 *Pimelobactor* sp. R48 및 내열성 미생물균주 등에서 발견되어 각광을 받고 있다. 이효소는 인

산화당을 경유하지 않고 Maltose를 trehalose로 분자내 당전이 반응을 통해 변환한다. MTSase도 분자내 당전이 효소의 일종이지만 이와 비슷한 분자내에서 당전이 작용을 하는 효소로서 sucrose를 paratinose로 전환하는 paratinose 생성 효소가 잘 알려져 있다. 이 효소는 Enzyme Nomenclature 1992년판에 EC5.4의 "mutase"로 분류되어 있는데 "Isomaltulose synthase"로 명명되어 있다. 따라서 maltose로부터 직접 trehalose로 전환하는 효소도 이 예를 따르면 "Trehalose Synthase"로 명명될 것으로 본다. 그러나 아직 이러한 효소에 대한 정확한 특성규명이 이루어지지 않아 연구자의 이해를 돕고자 밑에서 자세히 설명하기로 한다.

연구의 역사적인 배경 : 1990년 Lama 등은 호열성 고세균인 *Sulfolobus solfataricus*가 가용성 전분 분해 활성과 함께 전분으로부터 trehalose를 생성하는 활성이 있음을 발견하고[10], 부분 정제한 효소가 말토 올리고당, 아밀로스, 아밀로 펙틴 및 가용성 전분으로부터 trehalose를 생성한다는 사실을 보고하였다. 1995년도 일본농예화학회(Sapporo, Japan)에서 (주)林原생물화학연구소(Hayashibara Biochemistry Co.)의 연구그룹과 Kirin Beer(주) 응용 개발 센터의 연구그룹(각각을 H그룹과 K그룹으로 약함)에 의하여 새로운 trehalose 생성 효소에 관한 9편(H그룹)과 4편(K그룹)의 논문이 구두 발표되었으며, 계속해서 1996년도 일본농예화학회(Kyoto, Japan)에서 H연구 그룹과 K연구 그룹으로부터 다시 5편과 2편의 논문이 구두 발표된 바 있으며, 최근에는 이들 2그룹간에 여러편의 정식 논문으로 발표가 되고 있다. 즉, 이들 2그룹에 의해 신규의 trehalose 생성 효소계의 전모가 세계 최초로 밝혀지게 되었으며, 그 뒤 Binnema 등에 의해서도 유사한 효소가 보고 되고 있다.

반응기구 : 말토 올리고당 혹은 아밀로스로부터 trehalose를 생성하는 기전은 기본적으로 2가지 효소가 관여하여 반응이 2단계로 진행된다. 처음 효소 반응은 기질의 환원 말단쪽의 α -1,4-glucoside 결합이 α -1,1-glucoside 결합으로 전환되는 반응이다(반응 I). 이 반응에서는 기질의 환원 말단의 2번째 glucose 잔기의 C1-O 원자 사이가 절단되어 glucose가 한 분자 감소한 말토 올리고당 잔기 또는 아밀로스 잔기가 절단된 환원 말단 glucose의 C1-OH로 전이된다. 동시에 가수분해 반응이 수반되어 소량의 glucose가 생성된다. 반응I을 촉매하는 효소

는 기질의 환원 말단 glucose 잔기에 매우 높은 친화력을 가지며 쉽게 glucose를 유리시키지 않고 주로 분자내 전이 반응으로 α -1,1-glucoside 결합을 생성시키는 것으로 생각되지만, 반응계에 미리 비교적 높은 농도의 glucose를 첨가해 두면 기질의 비환원 말단에서 절단된 glucose와 교환이 되어 첨가한 glucose가 수용체로 될 수 있다는 사실도 K연구 그룹에 의해 증명되었다. 즉, 반응 I은 분명히 한 가지의 당전이 효소에 의해 촉매된다는 사실을 증명하는 것이다.

반응 I 다음에 일어나는 반응은 α -amylase 유사 효소 작용으로 trehalose가 만들어지 반응이다(반응 II). 이 효소에 대해서 K연구그룹의 논문에서는 trehalose만을 특이적으로 촉매하는 trehalose 遊離酵素라고, 말토 올리고당에 대해서는 가수 분해 작용을 나타내지 않는다고 주장하고 있다. 한편, K-연구 그룹의 논문에서는 이 효소가 α -amylase의 한 종류로 보고 있으며 약하지만 말토올리고당의 가수 분해를 하는 것으로 보고하고 있다. 즉, 양 연구 그룹간의 효소 특이성의 차이가 균주의 차이로 볼수 있으나 기본적으로는 같은 효소로 생각된다.

연구 동향

산업화 연구 동향 : Trehalose는 감미료, 식품, 화장품, 의약품제(백신, 호르몬, 혈액제제)의 안정제로 사용되며 臟器 보존제로서도 최근 주목을 받고 있는데, 주로 일본의 Hayashibara (林原)生物化學研究所(株)에서 trehalose 생성 효소 생성균의 탐색과 trehalose의 공업적인 생산법을 개발하여 다수의 국제 특허를 획득하여 보호하고 있다. 즉, 기존의 효모 추출법에 의한 생산단가(kg당 \$200이상)나 glutamic acid 발효 과정에서 부산물로 생성되는 trehalose의 생산단가(kg당 \$20)보다 훨씬싼 kg당 \$4이하로 낮추는 효소 개발과 효소 전환법의 개발로 독립 단계에 있는 것이다(표 1)[11]. 한편, 한국에서는 선일제비스(사) 등에서 연구 개발중에 있으며 산업적인 대량 생산은 아

직 어려운 실정이다. 표 2에서 현재까지 trehalose 생산 기술과 경제성을 비교하였다.

α , α -trehalose의 초기 생산 : 종래 trehalose 생산법으로서 1) 효모, 글루타민산 생산균 등에 의해 일반적인 생합성 경로를 이용하여 glucose, ATP, UTP를 사용한 반응, 2) 버섯, 유글레나 등에 의한 trehalose phosphorylase 방법, 3) glucose와 glucose-1-phosphate 이용 반응, 4) 곰팡이, 녹조류 등에 의한 trehalase 역반응 이용법 등이 있으나 모두 값싸고 대량으로 생산하기에는 난점이 있었다. 급변 소개되는 새로운 미생물계 효소에 의한 방법으로 trehalose 생산성은 10내지 25% 기질 농도에서 30 U/g 기질의 glycosyltransferase와 25 U/g 기질의 α -amylase첨가로 60℃-70℃ 반응시 약 40%의 수율로 trehalose가 생산되었다. 이때 당화 반응중에 debranching 효소를 첨가해 주면 수율은 76%로 상승하며 가용성 전분 대신에 부분적으로 액화시킨 옥수수 전분을 사용하면 수율은 80%이상으로 증가한다. 또한, 고세균의 효소는 내열성이므로 미생물의 오염, 전분의 노화반응 걱정이 없으며 고농도로 trehalose 생산이 가능하다.

전분으로부터 trehalose 생산 : MTSase와 MTHase를 동시에 아밀로스에 작용시키면 높은 수율로 trehalose가 생산된다. trehalose 생성율은 아밀로스 중합도에 의존하며 중합도가 높을수록 높아진다. Glucose 중합도 20이상의 아밀로스를 기질로 하는 경우 trehalose 생성율은 약 80% 이상이다[6]. 이는 전분을 기질로 고순도의 trehalose 생산 가능성을 시사하며 실제로 isoamylase 존재하에서 MTSase와 MTHase를 낮은 가수 분해율의 전분 액화 용액에 작용시켜보면 trehalose를 약 85%이상 함유한 당화액을 얻을수가 있다[7].

Maltodextrin으로부터 trehalose 생산 : Maltodextrin으로부터 trehalose을 생성하는 미생물은 현재 *Rhizobium*속, *Brevibacterium*속, 열내산균인 *Sulfolobus*속 등에 속하는 균주에

표 1. Trehalose 생산 기술 및 경제성의 비교

생산기술	제품가격(\$/kg)	생산기업	생산방법
효모추출법	200-250	Kirin(日本國)	맥주 발효후 부산물인 효모 균체 추출
발효법	20	Ajinomoto(日本國)	Glutamate 생산균 부산물로 직접 발효
효소전환법	4	Hayashibara(日本國)	전분으로부터 직접 효소 전환

표 2. 주요 미생물의 α -trehalose 생산 효소계

미생물	주요 효소계	최적 pH	분자량	수율	문헌
<i>Sulfolobus solfataricus</i> KM1	glycosyltransferase	4.5-6.0	74,000	80%	3
<i>Arhrobacter</i> sp. Q36	α -amylase	4.5-5.5	61,000	76%	2
	MTSase	5.6-6.4			
	MTHase	5.6-6.4			
<i>Pseudomonas putida</i> H262	trehalose synthase				4
<i>Pimelobacter</i> sp. R48	trehalose synthase	7.5	62,000	81	1, 4
<i>Thermus aquaticus</i> ATCC33923	trehalose synthase	6.5	105,000	81	1, 5

MTSase 활성과 MTHase 활성이 확인되고 있다[6]. *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC33909 유래의 2개의 효소가 정제되어 성질까지 연구되었다[8, 9].

Maltose로부터 trehalose 생산 : Maltose로부터 trehalose를 생성하는 미생물 효소중, MTSase는 Maltotriose 이상의 중합도를 가진 maltooligo당에 작용하여 환원 말단의 α -1,4-glycoside결합을 α , α -1,1-glucoside 결합으로 변환하지만, maltose에는 작용하지 않는다. 그러나, *Pimelobacter* sp. R48균주는 분자내 당전이 반응으로 maltose를 trehalose로 전환시키는 효소를 생산한다[4]. 분자내 당전이반응을 나타내는 효소로서 *Protaminobacter rubrum*[3], *Erwinia rhapontici*[10]가 생산하는 paratinose 생성 효소(EC 5.4.99.11; Isomaltulose synthase)가 알려져 있다. 이 효소는 sucrose를 paratinose(isomaltulose)로 변환하는 효소로 mutase로 분류되어 있다. 전술의 MTSase와 비슷하게 *Pimelobacter* sp. R48의 효소도 mutase에 분류되어 할 것으로 보인다. 본 효소는 Trehalose synthase라 명명하게 되었으며, maltose로부터 trehalose생성은 기질농도에 거의 영향을 받지 않는다. maltose 농도 20% 조건에서 trehalose 생성율은 약 81%이며, 이때 포도당은 3%가 생성된다. 한편, 이외에도 *Pimelobacter putida*와 대부분의 *Thermus*속 균주도 trehalose 생성 효소를 가지고 있다(표 2). 이들 효소는 maltose가 아닌 trehalose에 작용하여 가역적으로 maltose를 생성하지만, maltose를 trehalose로 변환시키는 반응보다는 약하다. 그러나 maltotriose, maltotetraose, kojibiose, isomaltose 등의 이당류에는 작용하지 않는 특징이 있다.

Maltose를 trehalose로 변환시키는 반응계로서 maltose phosphorylase와 trehalose phosphorylase 효소가 알려져 있으나, trehalose 생성 효소 생산균에 대해 phosphorylase 유사 활성을 검색하였으나 발견되지 않으며 동시에 glucose의 전이 반응도 인정되지 않았다. 따라서, 본 효소는 분자내 전이반응에 의해 maltose를 trehalose로 변환시키는 새로운 효소로 인정된 것이다.

연구방법

MTSase 활성은 maltopentaose를 기질로하여 환원력 감소를 Somogyi-Nelson법[3, 4]으로 측정하며, 1 Unit는 주어진 온도의 1분간에 1 μ mol의 maltopentaose를 α -maltotriosyltrehalose로 전환시키는 효소량이다.

MTHase 활성은 α -maltotriosyltrehalose를 기질로서 환원력의 증가를 위와 같은 방법으로 측정한다. 1 Unit는 주어진 온도의 1분간에 1 μ mol의 maltotriose를 유리하는 효소량으로 하였다. α -maltotriosyltrehalose로 전환시키는 효소량이다.

Maltose로부터 직접 trehalose로 전환하는 효소 활성은 5% maltose를 기질로 하여 일정 온도, 일정 시간에서 생성되는 trehalose를 trehalase와 glucose oxidase를 사용하여 정량한다.

이때 효소 활성 1 unit는 1분간에 1 μ mol의 trehalose를 생성하는 효소량으로 정의한다.

결론 및 전망

이상 2가지 새로운 trehalose 생성계에 대해서 소개를 하였다. trehalose 생합성은 trehalose-6-phosphate synthetase와 trehalose-6-phosphatase에 의한 것으로 간주되었으나 MTSase와 MTHase에 의한 trehalose 생성계, 혹은 maltose로부터 trehalose 생성효소가 많은 세균주에 발견되는 사실로부터 이들도 세포 안에서의 trehalose합성에 깊이 관여하고 있는 효소계일 것으로 생각된다. 이들 2가지 trehalose 생성 효소계, 즉 *Sulfolobus acidocaldarius*과 *Arhrobacter* sp. Q36의 MTHase, MTSase 그리고 *Thermus aquaticus* ATCC33923의 trehalose 생성 효소의 유전자분리에 의한 아미노산 1차 구조 결정 결과 이들이 역시 아밀라제 페밀리와 상동성이 인정되고 있다. 그러나 MTSase와 MTHase는 dextrin의 환원 말단쪽에 작용하는 점에서 기존의 아밀라제와는 다르다. 이들 신규 효소의 활성 부위의 구조 해석이 기대된다.

현재, 전문으로부터 trehalose의 공업적인 대량 제조법의 확립, 싼값으로 공급하려는 시도가 이루어지고 있으나 trehalose의 용도 개발이 왕성하게 연구될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Chaen H., Maruta, K., Nakada, T., Nishimoto, T., Shibuya T., Kubota, M., Fukuda, S. Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1996) Two novel pathways for the enzymatic synthesis of trehalose in bacteria. *Oyo Toshitsu Kagaku(J. Appl. Glycosci)* **43**: 213-221.
2. Tabuchi, A., Mandai, T., Shibuya T., Kubota, M., Fukuda, S., Sugimoto, T. and Kurimoto, M. (1995) Formation of trehalose from starch by novel enzymes. *Oyo Toshitsu Kagaku* **42**: 401-406.
3. Kobayashi, K., Kettoku, M., Miura, Y., Kato, M., Komeda, T. and Iwamatsu, A. (1996) Production of trehalose by new trehalose-producing enzymes from the Archae. *Oyo Toshitsu Kagaku (J. Appl. Glycosci)* **43**: 203-211.
4. Nishimoto, T., Nakano, M., Ikegami, S., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1995) *Biosci. Biochem. Biotechnol.* **59**: 2189-2190.
5. Nishimoto, T., Nakada, M., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1996) Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Biosci. Biochem. Biotechnol.* **60**: 835-839.
6. Maruta, K., Nakada, M., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1995) *Biosci. Biochem.*

- Biotech. **59**: 1829–1834.
7. 田淵彰彦, 万代隆彦, 福田惠温, 栗本雅司. (1995) 應用糖質 **42**: 401–406.
 8. Nakada, T., Ikegami, S., Chaen, H., Kubota, M., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1996) Biosci. Biochem. Biotech. **60**: 263–266.
 9. Nakada, T., Ikegami, S., Chaen, H., Kubota, M., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1996) Biosci. Biochem. Biotech. **60**: 267–270.
 10. Chiba, S. (1996) Comments for trehalose-forming enzymes. Oyo Toshitsu Kagaku (J. Appl. Glycosci.) **43**: 223–226.
 11. 전영중, (1997) 생물변환기술에 의한 기능성 당류의 상업적 생산. 식품산업과 영양 **2**: 10–15.