

## 내열성효소의 연구와 응용

김 광 원

위대한 수령 김일성동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《지금 우리 나라에서는 강냉이를 가지고 효소법으로 포도당을 만들고있습니다.》

(《김일성전집》 제58권 147페이지)

오늘 우리 나라에서는 강냉이로부터 효소법으로 포도당생산, 옥당생산, 기타 농마발효제품생산이 대대적으로 진행되고있으며 여기에 농마분해효소들인  $\alpha$ -아밀라제,  $\beta$ -아밀라제, 글루코아밀라제 등이 적극 리용되고있다. 식료공업뿐만아니라 의약공업, 일용품공업, 생물연료생산, 환경보호 등 여러 분야에서 효소의 역할은 점점 더 커지고있다.

효소는 촉매효율과 기질 및 반응특이성이 대단히 높은 생체촉매이다. 효소는 반응속도를  $10^6 \sim 10^{17}$ 배나 빠르게 한다. 실례로 오로티딘-5'-모노린산탈탄산효소는 반응속도를  $1.4 \times 10^{17}$ 배나 빠르게 하는데 이것은 비유해말하면 효소가 없을 때 40억년이 걸려야 일어나는 반응이 효소가 있을 때에는 불과 1s면 일어난다는 의미이다. 효소가 없으면 실제상 세포내반응은 진행되지 못한다. 효소반응에서는 부반응이 거의나 일어나지 않으며 순수한 립체이성체가 효률적으로 생성되어 생성물의 분리가 쉬워지고 환경에 주는 부담도 적어진다. 대부분의 효소는 몸온도, 중성pH 등 온화한 생리적조건에서 작용하는데 가혹한 조건에서 조작되는 공업생산공정에서는 쉽게 불활성화되기때문에 그 리용이 제한되고있다. 이로부터 극단한 조작조건에서도 견딜수 있는 효소를 찾아내기 위한 연구가 심화되였다.

내열성은 높은 온도에서 자기의 성질을 유지하는 물질의 능력이다. 효소도 단백질인 것만큼 대부분의 효소는 높은 온도에서 열변성으로 불활성화된다. 내열성효소는 높은 온도에서도 활성을 유지하는 효소를 말하는데 높은 온도에서 조작되는 공업생산공정의 리상적인 촉매후보로 주목되어왔다. 생산공정을 높은 온도에서 조작하면 여러모로 유리한데 실례로 반응속도가 훨씬 빨라지고 기질의 풀림도가 높아지며 점도가 떨어지고 미생물오염이 현저히 줄어든다.[11] 이로부터 내열성효소에 대한 많은 연구가 진행되였다.[12-17]

지난 시기 우리는 최적생존온도가  $80^{\circ}\text{C}$ 인 초호열성세균 *Thermotoga maritima*의 내열성  $\beta$ -글루쿠로니다제유전자를 대장균에 클론화하고 그로부터 발현되는 효소를 분리정제[1]한 다음 이 효소의 최적온도가  $85^{\circ}\text{C}$ 라는것을 밝혔다.[7] 계속하여 글리코실히드롤라제2족에 속하는 이 효소의 분자표면에 전하를 띤 아미노산들이 많이 들어있고 염다리가 더 형성되며 아단위접촉면의 소수성호상작용이 강한 분자구조적특성이 있다는것을 밝혔다.[2, 3]

내열성효소들은 식료품, 의약품, 생물연료, 팔프 및 종이, 세척제, 영양제의 생산과 가공 등 폭넓은 분야에 리용되어왔다. 가장 널리 알려진 실례는 유전자공학분야에서 혁신을 가져온 폴리메라제연쇄반응(PCR)에 리용되는 내열성폴리메라제(*Taq*폴리메라제와 그후에 개발된 내열성DNA폴리메라제)이다. 단백질공학의 출현으로 내열성효소들을 목적의식적으로 만들수 있게 되고 한편 자연계의 새로운 분리원천으로부터 많은 내열성효소들이 발견됨으로써 그 종류와 응용범위는 더욱더 다양해지고있다. 일부 내열성효소들은 낮은 pH, 고압, 높은 염농도와 같은 다른 가혹한 조건에서도 안정하게 활성을 유지한다는것도 밝혀졌으며 여러가지 극단환경조건들에서도 쓸수 있다는것이 증명되였다. 더우기 내열성효

소들은 계면활성제, 유기용매와 같은 변성제들의 존재하에서도 안정하다는것이 알려짐으로써 유기합성에도 리용할수 있게 되었다.[18] 이 논문에서는 내열성효소의 최근연구와 그 응용에 대하여 논의한다.

## 1. 호열성생물과 초호열성생물

호열성생물(thermophile)은 높은 온도에 적응하여 살아가는 생물을 말하는데 생존온도에 따라 중간정도호열성생물( $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ ), 고도호열성생물( $60\sim 80^{\circ}\text{C}$ ), 초호열성생물( $80^{\circ}\text{C}$  이상)로 구분한다. 호열성생물을 구분하는 생존온도는 연구자마다 약간씩 차이난다. 호열성생물들은 지열구역, 화산지대, 뜨거운 온천지대, 깊은바다밑의 열수분출구, 태양빛으로 뜨거워진 토양, 지열로 뜨거워진 원유 등의 자연환경과 산성의 광산폐수, 거름더미, 폐기물로 처리된 식물 등의 인공환경으로부터 분리되고있다.[19]

호열성생물은 1960년대 어느 한 자연공원에 대한 조사과정에 처음으로 발견되었다. 1970년대와 1980년대초에는 깊은 바다밑의 열수분출구와 화산지대에서 호열성미생물들이 발견되었다.[20] 이 기간에 발견된 생존온도가 가장 높은 호열성미생물은 생존온도가  $85^{\circ}\text{C}$ 인 *Sulfolobus acidocaldarius*였다.[21] 처음으로 발견된 첫 초호열성생물(hyperthermophile)은  $97^{\circ}\text{C}$ 에서 살수 있는 새로운 막대모양의 메탄생성균 *Methanothermus fervidus*였다.[22] 점차 많은 과학자들이 이 연구에 뛰어들면서 새로운 여러가지 호열성생물들이 발견되었는데 고압멸균기의 설정온도인  $122^{\circ}\text{C}$ 에서도 살아남을수 있는 *Methanopyrus kandleri*가 발견됨으로써 생명존재의 한계온도가 다시 정립되었다.[23]

호열성생물들을 분류해보면 세균(bacteria)과 고세균(archaea)의 원핵생물들이 대부분이고 진핵생물은 보통  $60^{\circ}\text{C}$ 까지의 온도에서 생존할수 있다. 호열성세균(thermophilic bacterium)의 대표적인 속은 *Thermus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhodothermus*, *Thermoanaerobacter*이고 호열성고세균(thermophilic archaeon)의 대표적인 속은 *Methanobacterium*, *Thermoplasma*이다. 초호열성세균(hyperthermophilic bacterium)의 실례로서는 *Aquifex*, *Thermotoga*, *Hydrogenobacter* 속의 세균들을 들수 있다. 그러나 초호열성생물은 대체로 고세균이며 그중 일부 대표적인 속을 보면 *Methanococcus*, *Methanothermus*, *Archaeoglobus*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermoproteus*를 들수 있다.[11, 24] 실례로 깊은바다밑의 열수분출구가까이의 뜨거운 물속에서 사는 초호열성고세균(hyperthermophilic archaeon)인 *Pyrolobus fumarii*는  $105^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 제일 잘자라는데  $113^{\circ}\text{C}$ 에도 견딘다고 한다.

다종다양한 호열성생물들가운데서 3종의 초호열성고세균 *Pyrococcus furiosus*(생존의 최적온도  $T_{\text{최}}$ 는  $98\sim 100^{\circ}\text{C}$ ), *Thermococcus kodakarensis*( $T_{\text{최}}$ 는  $85^{\circ}\text{C}$ ), *Sulfolobus solfataricus*( $T_{\text{최}}$ 는  $80^{\circ}\text{C}$ )와 한종의 초호열성세균 *Thermotoga maritime*( $T_{\text{최}}$ 는  $80^{\circ}\text{C}$ )가 높은 온도에서 생명체가 살아가는 기초물질새를 연구하는 모형생물로 리용되고있다.[20] 호열성생물에 커다란 흥미를 가지게 된것은 물의 끓음점이상의 높은 온도에 세포와 단백질이 어떻게 적응되어왔는가에 대한 호기심과 그러한 특성들을 어떻게 써먹겠는가에 대한 연구심때문이다. 호열성세포의 적응특성을 살펴보면 게놈크기가 작다는것, GC함량이 낮다는것, 세포막이 포화기름산들로 되어있어 높은 온도에서도 형클어지지 않고 견고하다는것, 많은 샤페론과 샤페로닌이 합성되어 생체거대분자들의 접히기를 방조하며 자이라제를 억제하여 DNA를 보호한다는것 등을 들수 있다.[11, 25] 대표적인 호열성생물과 대응하는 내열성효소들을 표 1에 묶어주었다. 표 1에서 알수 있는바와 같이 호열성생물로부터 분리한 내열성효소들은 아주 다양한 목적에 리용된다.

표 1. 몇가지 호열성생물과 대응하는 내열성효소

호열성생물	분류	내열성효소	최적온도와 안정성	공업에서 가능한 응용분야	참고 문헌
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	호열성 세균	$\alpha$ -아밀라제	$T_{\text{최}}=70^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=7.0$ ), $90^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=6\text{h}$	농마분해, 빵제조, 올리고당합성	26
<i>Methanococcus jannaschii</i>	초호열성 고세균	"	$T_{\text{최}}=120^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=5.0\sim 8.0$ ), $100^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=50\text{h}$	"	27
<i>Thermotoga thermarum</i>	초호열성 세균	크실라나제	$T_{\text{최}}=95^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=7.0$ ), $90^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=60\text{min}$	종이 표백	4, 28
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	초호열성 세균	"	$T_{\text{최}}=90^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=7.0$ ), $100^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=47\text{min}$	"	29
<i>Meiothermus ruber</i>	호열성 세균	프로테아제	$T_{\text{최}}=100^{\circ}\text{C}$ , $80^{\circ}\text{C}$ 에서 안정	세척제, 빵제조, 양조	6, 30
<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>	호열성 세균	"	$T_{\text{최}}=85^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=8.0$ ), $80^{\circ}\text{C}$ 에서 안정	"	31
<i>Rhodothermus marinus</i>	호열성 세균	키틴나제	$T_{\text{최}}=70^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=4.5\sim 5.0$ ), $90^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=3\text{h}$	식료품에서 키틴수식, 건강보호약물제조	32
<i>Thermococcus chitonophagus</i>	초호열성 고세균	"	$T_{\text{최}}=70^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=7.0$ ), $120^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=60\text{min}$	"	33
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	호열성 세균	리파제	$T_{\text{최}}=75^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=8.0$ ), $70^{\circ}\text{C}$ 에서 안정	생물연료, 화장품, 세척제, 트랜스에스테르화	34
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	호열성 세균	"	$T_{\text{최}}=70\sim 75^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=7.5$ ), $60^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=60\text{min}$	"	35
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	호열성 세균	셀룰라제 (엔도글루카나제)	$T_{\text{최}}=50\sim 85^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=5.0$ ), $70^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=336\text{h}$	생물질의 당화, 방직, 세척제	8, 36
<i>Thermotoga neapolitana</i>	초호열성 세균	(엔도셀룰라제)	$T_{\text{최}}=106^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=6.0\sim 6.6$ ), $106^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=130\text{min}$	"	37
<i>Thermus thermophilus</i>	호열성 세균	폴루라나제	$T_{\text{최}}=70^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=6.5$ ), $80^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=2\text{h}$	농마의 당화, 프테 바이오틱스, 견딜성 농마, 빵제조	38
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	초호열성 고세균	"	$T_{\text{최}}=95\sim 100^{\circ}\text{C}$ ( $\text{pH}_{\text{최}}=3.5$ ), $100^{\circ}\text{C}$ 에서의 $T_{1/2}=45\text{min}$	"	39

$T_{\text{최}}$ 는 최적온도,  $\text{pH}_{\text{최}}$ 는 최적pH,  $T_{1/2}$ 는 반감기임.

## 2. 내열성효소-구조와 기능의 적응

보통효소든 내열성효소든 어느것이든 할것없이 구조의 기본은 20가지 아미노산이 펩티드결합으로 연결된 단백질분자이다. 하다면 내열성효소에 과연 어떤 구조적특징이 있기에 높은 온도에서도 그렇게 안정한가 하는것이 흥미를 끌고있다. 이것은 또한 단백질공학적방법으로 현존하는 보통효소들을 높은 열안정성을 가지도록 목적지향성있게 설계 및 개변시키는데서도 중요한 문제이다. 여러가지 요인들이 단백질의 열안정성에 기여하며 또 단백질마다 차이가 있다. 단 한가지 요인때문에 단백질의 열안정성이 높아질수는 없다. 이 분야에서 폭넓은 연구가 진행되었음에도 불구하고 단백질의 열안정성에 관하여서는 많은것이 여전히 불명확하다. 여러가지 구조적특징들이 결합되어 내열성효소들의 열안정성에 이바지하는데 그 일부를 설명하면 아래와 같다.

## 1) 내적인 요인

## (1) 분자의 호상작용

호소의 열안정성을 높이는 내적인 요인을 보면 소수성호상작용, 이온호상작용, 수소결합, 디설피드결합, 금속결합과 같은 분자의 호상작용이 많고 더우기 분자가 보다 뻥뻥이 충전되고 루프들이 짧고 안정하며  $\alpha$ 라선이 안정한것으로 하여 단백질구조가 보다 치밀하고 견고하다는것을 들수 있다.[40]

이온호상작용은 단백질의 열안정화에 기여하는 중요한 요인이다. 일반적으로 호열성생물의 단백질들에는 보통단백질에 비해 글루타민산, 리진, 아르기닌과 같은 전하를 띤 아미노산이 많이 들어있다.[41] 염다리와 이온그물구조의 형성으로 정전기적호상작용이 많아지면 단백질은 높은 온도에 잘 견딘다.[42, 43] 염다리가 많이 형성되면서 정전기적호상작용이 최적화되는것이 초호열성생물의 단백질들이 열에 안정해지는 기본요인이다. 이런 호상작용은 호열성생물의 단백질들에서는 그리 뚜렷하게 나타나지 않으며 보통단백질에서는 거의 찾아볼수 없다.[42] 열에 안정한 단백질에서 이온쌍들은 한곳 또는 여러곳에 국부적으로 밀집되어 그물구조를 이룬다. 열안정화에서 이 그물구조들의 기여몫이 개별적인 이온호상작용의 총합보다 크기때문에 이온쌍들의 정렬이 열안정화에 있어서 상당히 중요하다는것을 알수 있다.[44]

수소결합도 호열성단백질의 열안정화에 기여하는데 폴리펩티드사슬안에서뿐아니라 린접하는 물매질과도 수소결합이 형성된다. 전기적으로 중성인 수소결합이 글리세르알데히드-3-린산수소떼기효소(GAPDH)의 열안정화에 기여한다는것이 밝혀졌다.[45]

접히기과정에 단백질중심부에 들어가는 소수성아미노산잔기들은 안정화에서 가장 중요한 역할을 한다. 즉 소수성호상작용은 단백질의 열안정화에 크게 기여한다.[46] 단백질의 열안정성은 총적인 소수성과 직접적인 련관이 있다. 단백질접히기과정에 중심부에 1개 메틸기가 파묻히면 안정성은 5.4kJ/mol만큼 증가한다.[47] 호열성세균 *Hydrogenobacter thermophilus*에서 분리한 시토크롬c552의 1개 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 단백질중심부에서 1개의 히드록실기를 제거하면 이 효소의 소수성이 증가하여 결국 녹음온도( $T_m$ )가 6°C만큼 높아진다[48]고 한다.

초기에 디설피드결합은 열안정화에 참가하지 않는다고 생각하였는데 그 이유는 세포질의 환경이 환원상태이고 게다가 높은 온도에서는 이 결합이 환원되기때문이다. 그후의 여러 연구결과로 이 견해가 부정되었으며 디설피드결합이 단백질의 안정화에서 중요한 역할을 한다는 결론이 얻어졌다. 실례로 호열성세균 *Bacillus pumilus* ML413카탈라제의 열안정성과 촉매효율은 디설피드결합의 도입으로 현저히 개선되었다. 이 경우에 1개 디설피드결합의 형성으로 60°C에서의 반감기( $T_{1/2}$ )는 40min정도 길어졌고 촉매효율은 40% 증가하였다.[49] 연구결과 각이한 호열성생물들의 단백질에는 디설피드결합이 풍부히 들어있다는 게놈학적증거가 얻어졌다.[50] 이 연구에서 단백질디설피드산화환원효소가 호열성생물에서 세포내디설피드결합의 형성과 관련하여 매우 중요한 효소라는것이 밝혀졌다.

금속이온은 내열성효소의 안정성과 관련하여 충분히 연구되지 않았지만 효소의 활성화와 안정화에 기여하는 또 다른 중요한 요인이라는것이 밝혀졌다. 호열성세균 *Bacillus licheniformis*의 크실로즈이성화효소에서는  $Mn^{2+}$ [51]이, 호열성세균 *Clostridium thermocellum*의 셀로비오히드롤라제에서는  $Ca^{2+}$ [52]이 각각 열안정화에 기여한다는것이 확인되었다.

단백질1차구조의 아미노산조성은 분자의 호상작용과 립체배좌에 관하여 많은것을 말해준다. 호열성생물과 보통생물의 단백질아미노산조성을 비교해본 결과 호열성생물단백질에서는 아미노산의 차이로 극단한 온도조건에서의 안정성이 높아진다고 한다. 호열성생물단백질

들의 아미노산조성의 일부 특징을 보면 전하를 띤 아미노산잔기들이 추가되고 소수성아미노산이 많으며 전하를 띠지 않은 극성아미노산잔기들이 적고 방향족아미노산잔기들이 많다고 한다.[53] 앞에서 설명한바와 같이 호열성생물의 단백질들에는 전하를 띤 아미노산들이 많이 들어있어 이온호상작용이 많고 결국 구조가 안정해진다. 내열성효소들에서는 흔히 Gly이 Ala로, Ser이 Ala로, Ser이 Thr로, Lys이 Arg로, Asp이 Glu로 치환된다고 한다.[54] 이러한 치환으로 단백질의 내부소수성이 강해지고 유연성이 감소함으로써 열안정화가 이루어진다. 열에 못견디는 아미노산들이 호열성단백질에도 존재하지만 그것들은 속에 들어가 물에 드러나지 않도록 단백질립체배좌가 이루어짐으로써 분해되지 않고 보호된다고 한다.[55]

## (2) 분자의 립체배좌

내열성효소들의 립체배좌세기는 두가지 상반되는 특성 즉 유연성과 견고성에 의존한다. 여기서 유연성은 효소의 촉매기능과 연관되어있고 견고성은 립체배좌의 안정성과 연관되어있다. 내열성효소는 보통효소에 비해 견고하며 이 특성으로 하여 효소가 높은 온도에서도 불활성화되지 않는다. 효소단백질이 견고하기때문에 단백질분해를 잘 받지 않으며 화학물질이나 높은 온도에 의한 변성이 쉽게 일어나지 않는다.  $\alpha$ 라선의 안정화, 정전기적 호상작용, 디설피드결합과 같은 요인들이 단백질의 견고성에 기여한다.[40, 56]

전체 배열이 완전히 해명된 20개의 계놈을 비교해본 결과 호열성단백질들은 해당한 보통단백질들보다 길이가 짧다는것이 밝혀졌다. 더우기 호열성단백질배열들을 정렬시켜본 결과 표면에 드러나는 루프영역들이 배열에서 탈락되어있었다.[57] 루프영역은 단백질열변성의 시작점이라고 보기때문에 그것이 없거나 짧아지면 단백질은 안정화된다. 한편 이온호상작용과 같이 안정화에 이바지하는 호상작용들이 추가되어도 단백질의 유연성은 감소된다.[58] 단백질에서 유연한 부위를 예측한 다음 그것을 견고하게 하는것은 단백질의 열안정성을 높이는 효과적인 방도이다.[59]

이미 설명한바와 같이 내열성효소에서는 단백질내부에 소수성아미노산잔기들이 파묻히면서 소수성호상작용이 상당히 강화되고있다. 이 요인으로 해서 효소분자가 보다 뻣뻣이 충전되고 반 데르 발스호상작용이 더 잘 이루어지며 결국 열안정성이 높아진다. 알라닌, 이소로이신, 프롤린의 함량이 늘어나면 소수성중심부가 더 뻣뻣이 충전되고 단백질의 루프들이 더 견고해진다고 한다. 그리고 속에 빈공간이 없어지는것, 루프들이 짧아지는것, 단백질중심부에서 결사슬들의 충전이 최적화되는것과 같은 요인들의 배합에 의해서도 내열성효소들이 치밀해진다.[60, 61] 그밖에 다른 내적인 요인들 실례로 라선허성경향성이 강한 아미노산잔기들의 증가에 의한  $\alpha$ 라선의 안정화, 올리고머의 형성과 같은 도메인과 아단위들사이의 호상작용의 안정화 등에 의해서도 단백질의 열안정성이 높아진다고 한다.[40, 56]

## 2) 외적인 요인

높은 단백질농도나 기질, 활성화제, 도우인자, 특이적인 염과 같은 여러가지 외적인 요인들도 단백질의 안정화에 기여한다는것은 잘 알려진 사실이다. 높은 압력의 환경조건에 의해 초호열성단백질의 안정성이 유도된다는것도 밝혀졌다. 깊은 바다밑의 열수분출구와 같은 환경에서는 온도도 높고 압력도 높기때문에 단백질들은 고온, 고압의 두 극단환경조건에 모두 적응된다. 염들도 금속이온들의 특이적인 호상작용을 통하여 혹은 물의 활동도에 영향을 주는 염효과를 통하여 단백질을 안정화시킨다.[55]

삼투조절물질은 원래 호염성생물(halophile)이 높은 염조건에서 삼투균형을 유지하기 위하여 생성하는 물질이지만 호열성생물이 최적생존온도이상에서 살아갈 때 생성하는 물질이기도 하다. 고리형-2,3-비스리글리세린산, 디글리세롤린산, 만노실글리세린산, 디미오이

노시톨린산과 같은 삼투조절물질들이 높은 온도에 응답하여 생성된다는것이 밝혀졌다.[62] 여러 연구를 통하여 이 삼투조절물질들이 여러가지 내열성효소들의 열안정화제로 작용한다는것이 밝혀졌다.[44, 58] 삼투조절물질들인 글리신과 소르비톨은 *Lepidium draba* 페록시다제의 운동학적특성과 열안정성을 개선한다고 한다.[63] 화학적가교, 고정화, 글리코실화와 같은 기타 환경요인들도 열안정화에 영향을 준다.[56] 호열성생물의 단백질들은 이상의 각이한 열안정화요인들을 배합하여 리용하고있는데 어느 경우에도나 적용되는 일반규칙, 만능처방은 없다.

한편 안정한 단백질을 설계하려는 목적에서 호열성단백질과 보통단백질들을 식별해내기 위한 흥미있는 연구들도 진행되었다. 호열성단백질과 보통단백질의 식별에는 기계학습기술이 널리 적용되고있는데 실례로 신경망, 론리기능, 지지벡토르기계, 회귀분석, 최린접법, 메타학습 등에 기초한 여러가지 수법들을 들수 있다. 연구결과 신경망에 기초한 수법에서 호열성단백질과 보통단백질의 식별효율이 그중 높았다고 한다. 높은 온도에서의 단백질안정화에 기여하는 가장 중요한 특성들을 판정하는데도 기계학습알고리즘이 리용되었다.[64, 65]

### 3. 효소개변을 위한 합성생물학적연구

합성생물학은 현대생물학의 원리들과 구조설계, 수자조종과 같은 공업에서의 학문적 원리들을 결합시킨 경계과학이다. 어느 한 공학연구소가 정의한데 의하면 합성생물학은 생물로서의 새로운 부분품이나 기계, 체계를 설계하여 만들어내며 현재 자연계에 존재하는 생명체계를 재설계하는 학문이다. 이 분야에서 커다란 기술적진보가 이룩됨으로써 현대공업과 농업, 의학, 환경보호 등 많은 분야들에서 자원과 에너르기고갈, 건강장애, 환경오염과 같은 주요문제들이 해결될수 있게 되었다. 2016년 1월 어느 한 나라에서 발표된 보고서인 《세계적인 합성생물학시장: 기회와 예측, 2014-2020》에 의하면 2015년에 합성생물학제품들의 시장규모는 52억 4 570만US\$에 달하였고 세계적으로 565개의 연구기관들이 이 분야에 새롭게 뛰어들었다. 같은해에 세계적으로 81개의 기업들이 합성생물학적방법으로 116가지의 제품들을 개발하였으며 그가운데서 제약공업과 화학공업, 에너르기분야의 제품들이 47%를 차지하였다. 그중 공업용 및 농업용효소제품은 9가지로서 이미 시장에서 판매되고있다. 실례로 공업용효소인 휴엘자임(《FUELZYME®》)과  $\alpha$ -아밀라제는 섬유소를 리용한 에타놀생산 등에 리용되고있다.[10, 66]

합성생물학의 발전으로 효소단백질의 열안정성을 높일수 있는 효소개변의 새로운 수단이 마련되었다.(그림 1) 최근연구에 의하면 내열성효소들은 N말단과 C말단에 폭넓은 수소결합호상작용과 방향족클라스터들을 가지고있어 그 견고성이 증대되고있다고 한다.[67] 이것은 효소의 특정한 부위들에 인위적으로 이러한 변화가 생기게 하면 보통효소를 내열성 효소로 변화시킬수 있다는것을 의미한다. 재조합DNA기술을 리용한 부위지정변이도입과 같은 전통적인 효소공학작업방법이 지금까지 잘 연구되고 그 공정이 최적화된것만큼 이 분야에 적극적으로 리용되고있다. 이 전통적인 수법을 리용하여 수많은 효소들이 개변되었으며 결국 운동학적 및 촉매적특성의 개선, 열안정성을 비롯한 효소안정성의 증가, 알로스테릭조절의 저해, 기질특이성의 향상 등 여러가지 특성변화연구결과들이 얻어졌다.[68] 그러나 성공률이 낮고 가격이 높으며 공정에 시간이 걸린다는 등의 부족점으로 그 유용성에 제한이 있다.

합성생물학은 주로 유전정보가 새롭게 씌여지도록 하는데 응용됨으로써 비천연유전자와 효소들을 설계하는데 도움을 주고있다. 효소들의 열안정성을 높일수 있는 특정한 부위들에 가능한 모든 변이를 일으킨 유전자들을 신속히 그리고 직접 설계하고 합성하는것이 더

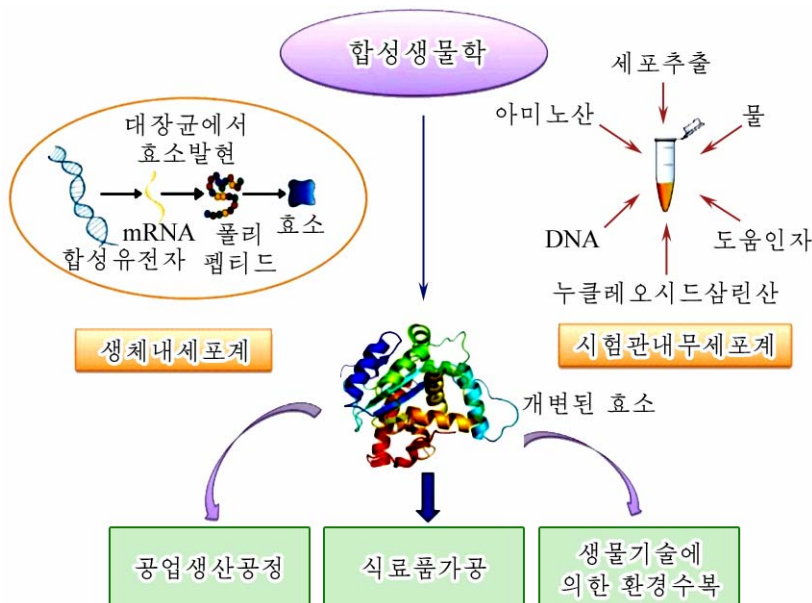


그림 1. 합성생물학적방법으로 생산하는 내열성효소와 그 응용분야

욱더 손쉬운 공정으로 되고있다. 이런 견지에서 컴퓨터지원유전자설계도구가 유전자구축물들을 전혀 새롭게 만들어내도록 개발되었다. 이 도구를 리용하면 유전자꼬리부분, 프로모터, 열린읽기틀을 비롯한 유전자요소들을 쉽게 추가, 삭제, 편집, 변경, 결합할수 있다.[69] 이러한 합성유전자들을 주로 두가지 계 즉 세포계(cell-system)와 무세포계(cell-free system)에서 전사 및 번역시킬수 있다.[70]

### 1) 효소개변을 위한 세포계

최근에 특정한 아미노산의 코돈을 삽입하거나 치환하는 유전자의 부위지정변이에 기초하여 효소들이 개변되고있다.[71] 이와 함께 내열성효소의 유전자를 완전히 새롭게 합성하는 기술도 적용된다. 변이된 유전자는 재조합DNA기술로 적당한 클론화 및 발현계속에 도입한다. 개변된 효소들을 생산하기 위한 발현숙주로 가장 널리 리용되는것은 대장균, 고초균, 효모와 같은 세포계들이다. 개변된 내열성효소들을 세포계들에서 성과적으로 생산한 많은 연구결과들이 발표되었다. 한 연구집단은 *Geobacillus thermodenitrificans* C5에서 분리한 크실라나제의 열안정성을 높였다.[72] 연구자들은 프롤린과 글루타민산으로 치환하는 부위지정변이도입으로 6개의 크실라나제변이체들을 만들었다. 변이체들은 75°C까지 안정하였으며 야생형크실라나제보다 열안정성은 13배나 높아졌다.

류사하게 다른 연구에서는 *Aspergillus niger* N25로부터 분리한 재조합phyA변이피타제의 열안정성을 개선하였다. 변이효소는 촉매효율이 현저히 개선되었고 열처리후 반감기가 최대로 길어졌다.[73, 74] 한 연구에서는 열안정성을 높이기 위하여 니트릴나제의 C말단영역을 개변시켰다. 개변된 효소는 높은 온도에서의 안정성이 14배나 높아졌다. 비록 효소들의 개변에 부위지정변이도입수법이 널리 적용되고있지만 성공률이 낮고 시간이 많이 걸리며 가격이 높은것이 문제이다. 게다가 단백질저렴물이 낮고 접히기가 부정확하며 발현변화가 심하고 안정성이 낮으며 발현산물이 불용성으로 되는것으로 하여 보다 폭넓은 응용이 제한을 받고있다. 유전자편집을 위한 분자생물학수단들이 계속 개선됨으로써 내열성효소생산의 효율은 더욱 높아지고있다.

최근 연구자들은 유전자편집도구 특히 아연손가락누클레아제(ZFN), 전사활성화제류사 효과인자를 리용한 누클레아제(TALEN), CRISPR/Cas계에 대한 연구를 심화시키고있다.[5, 9, 75, 76] CRISPR/Cas계에서 CRISPR(크리스퍼라고 함.)는 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats의 약자로서 우리말로 《밀집되어 규칙적인 간격으로 린접한 짧은 팔린드롬반복배열》로 번역된다. 이 이름은 배열구조의 특징을 그대로 표현한것으로서 규칙적인 간격으로 린접한(Regularly Interspaced) 짧은 팔린드롬형(Short Palindromic)의 반복배열(Repeat, 길이가 30~40bp인 동일한 배열)들이 계놈우의 한곳 또는 여러곳에 국한되어 밀집(Clustered)되어있는것을 가리킨다. 반복배열들사이에는 길이가 거의 같은 다양한 사이배열(spacer)이 들어있어 반복구조를 취하고있다. 계놈전체 배열이 밝혀진 세균종의 50%, 고세균종의 90%가 CRISPR를 가진다고 한다. 많은 경우 CRISPR는 선도배열, CRISPR관련(Cas) 유전자무리와 함께 존재한다.

CRISPR/Cas계는 외래유전자를 절단할수 있는데 이 기능은 진핵생물에서 관찰되는 RNA 간섭(RNAi)과 아주 류사하다. 이 두가지는 모두 작은 RNA로서 전사된 RNA가 표적배열과 상보적으로 결합함으로써 표적배열을 절단한다. 한편 CRISPR/Cas계(그림 2)의 특이한 작용

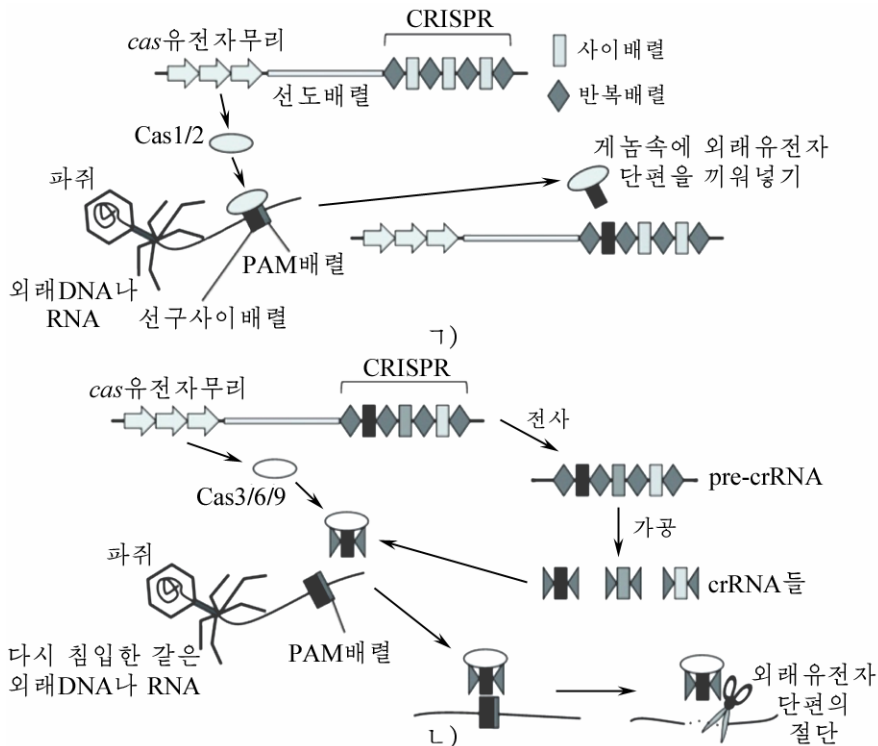


그림 2. CRISPR/Cas계

- 1) CRISPR/Cas계에 의한 외래유전자단편의 삽입: 세균에 침입한 파취나 플라스미드 등의 외래유전자의 일부가 떨어져나와 사이배열로서 CRISPR에 끼여들어간다. cas유전자무리의 일부인 Cas1/2는 외래 유전자의 PAM배열을 인식함으로써 유전자단편을 절단하고 사이배열영역말단에 있는 선도배열의 바로 아래에 이것을 삽입한다. 2) CRISPR/Cas계에 의한 외래유전자의 인식과 배제: 지난 시기 세균에 침입한 외래유전자가 다시 침입하면 사이배열영역전체가 전사되어 pre-crRNA가 만들어진다. pre-crRNA는 가공을 받아 짧은 crRNA로 되며 Cas3/6/9와 복합체를 형성한다.

이 복합체들은 마지막에 침입한 외래유전자의 PAM배열을 인식하여 거기에 결합하여 상동인 배열을 가지는 외래유전자단편을 절단한다.



특징은 ① 외래유전자단편을 게놈우에 보존할수 있다, ② 외래유전자의 재침입때 기억한 배열정보에 기초하여 획득면역물림새로서 작용한다, ③ 여러개의 외래유전자단편이 국한된 영역안에 반복배열을 끼여 정렬하고있다, ④ 선구CRISPR-RNA(pre-crRNA)로서 전사된 후에 1개 사이배열단위로 가공된다는것(crRNA로서 가공) 등을 들수 있다. CRISPR/Cas계가 획득면역물림새로 작용하려면 세 단계 즉 ① 외래유전자단편의 CRISPR안에로의 획득, ② 전사-가공에 의한 CRISPR의 발현, ③ 외래유전자의 절단이 중요하다.[122] 유전자편집도구가 개선됨에 따라 내열성효소로서의 개변효율은 계속 높아질것이다.

## 2) 효소개변을 위한 무세포계

효소개변을 위하여 무세포계를 리용하면 세포계를 리용할 때의 여러 제한성들을 극복할수 있다. 무세포계는 세포의 성장에 의존하지 않기때문에 효소합성을 직접 조절할수 있는 우점이 있다.[77] 열린계에서는 효소합성에 리용되는 반응환경을 직접 조작할수 있기때문에 효소의 개변이 훨씬 더 쉽고 그 성능도 높다. 결과 전사 및 번역과정을 실시간으로 추적하고 조작할수 있다. 무세포계에서는 전사의 주형으로서 선형DNA가 리용되며 생체내실험조건에서의 유전자클론화와 미생물형질전환단계들에 소비되는 시간을 절약할수 있다.[78] 더우기 무세포계에서는 번역후수식과 화학적인 결합이 아주 편리해진다.[70] 이 계가 개척단계에 있기때문에 대부분의 연구가 무세포계의 최적화에 집중되고있다. 이런 견지에서 *Vibrio natriegens*[79], *E. coli*[80], *Pseudomonas putida*[81, 82]와 같은 미생물세포로부터 얻은 다양한 무세포계들이 개발되어 단백질합성에 리용되고있다. 최근에는 포유동물세포(CHO)용해물이 녹색형광단백질과 스트렙토키나제의 생산에 리용되었다.[83] 효소를 보다 적극적으로 개변하기 위하여 연구자들은 무세포계에 비천연아미노산도입, 효소합성, 정확한 접히기의 공정을 포함시키고있으며 효소의 열안정화도 실현하고있다.

비천연아미노산의 도입 최근에는 극단환경조건에서의 안정성을 비롯한 폭넓은 기능개변을 실현하기 위하여 20가지 표준아미노산에 구애됨이 없이 자연계에 존재하지 않는 비천연아미노산(unnatural amino acids: uAA)을 효소단백질구조에 도입하기 위한 연구도 심화되고있다.[84] 이러한 연구가 무세포계에서는 훨씬 쉬워진다. 그리고 이러한 연구는 새로운 기능, 우수한 특성을 가진 효소들을 설계제조하는데서 새로운 전망을 열어놓고있다. 효소에 uAA를 도입하는 한가지 방법은 비천연염기쌍을 도입하여 유전암호를 변경시키는것인데 비천연염기가 들어있는 mRNA의 전사로 uAA가 들어있는 폴리펩티드의 번역이 실현된다.[85] 최근연구에서는 한창 길어지는 효소의 폴리펩티드폴격에 uAA를 도입할수 있는 아미노아실-tRNA신타제들을 설계하였다.[86, 87] uAA의 도입은 내열성효소를 얻을수 있는 전도유망한 방법으로 인정되고있다.

효소의 합성과 적당한 접히기 시험관내실험조건외 무세포계를 리용하면 생체내실험조건외 세포계를 리용할 때에는 실현하기 어려운 높은 성능의 효소합성과 정확한 효소단백질 접히기도 실현할수 있다. 무세포계에서는 여러개의 mRNA가 효소로 동시에 번역될수 있다. 따라서 이러한 계에서는 여러 단계에 걸치는 복잡한 정제공정을 거침이 없이 변이효소를 높은 거둢률로 얻어낼수 있다.[70, 88] 더우기 촉매작용에 금속이나 특이적인 기능원자단이 요구되는 효소들도 무세포계에서는 손쉽게 합성될수 있다. 그외에도 세포계에서는 여러 효소가 참가해야 하고 또 매우 어려운것으로 되어있는 번역후수식도 무세포계에서는 훨씬 쉬워진다.[89]

한편 합성생물학적방법을 적용하면 여러개의 디설피드결합과 수많은 수소결합의 형성으로 천연립체배좌를 가진 효소로 정확히 접혀지게 할수 있다. 이 목적을 달성하기 위하여

산화환원완충제로 반응혼합물을 전처리하고 샤페론을 넣어주며 특이적인 디술피드결합형성 효소를 첨가해준다.[90] 무세포계에 필요한 성분들을 적절히 포함하는 한가지 중요한 효소합성모형이 PURE(Protein synthesis Using Recombinant Elements, 재조합요소들을 리용하는 단백질합성)계인데 이 계에는 46개의 tRNA와 대응하는 모든 효소, 31개의 재조합번역인자들이 들어있다. 이 계는 효소를 합성하고 효소단백질에 uAA들을 도입하는데 성과적으로 적용되었다.[77] 이런 견지에서 아미노산분해효소와 엔도뉴클레아제 I 이 없는 대장균 유래의 정교한 무세포추출물이 안정한 단백질발현에 리용되었다. 이렇게 얻은 무세포계에서 단백질이 아주 높은 거둢률로 생산되었다.[91] 따라서 합성생물학수단으로서의 무세포계는 열안정화를 위한 효소의 합성과 효소단백질의 정확한 접히기에 유용하다.

#### 4. 내열성효소응용의 최근추세

50°C이상의 높은 온도환경에서 사는 미생물들의 세계에 대한 연구가 폭넓게 진행됨에 따라 이 자연계의 형성과 적응력에 대한 많은 자료가 얻어졌다. 높은 온도환경에서 사는 미생물들은 내열성효소들을 생성하는데 이 효소들이 생물공학의 여러 분야에 응용되면서 생물경제발전의 귀중한 보물고가 마련되고있다. 높은 온도환경의 생물다양성조사가 활발히 진행됨에 따라 새로운 연구방법도 수립되고 혁신적인 연구결과도 얻어지면서 그 폭과 내용이 부단히 갱신되고있다. 특히 내열성효소의 연구로 하여 생물공학에서 호열성미생물들은 커다란 관심을 끌고있다.[92] 생물경제의 여러 공업생산공정들에서 다종다양한 내열성효소들을 가진 호열성생물들이 적극적으로 리용되고있다. 내열성효소들이 현대공업생산공정들에 도입되면서 종전의 보통효소들은 차츰 밀려나고있다.[56]

그러나 호열성생물 및 초호열성생물에 대한 연구에도 제한성이 있는데 실패로 그러한 생물들의 분리 및 동정이 어렵고 배양하기는 더욱 힘들다. 이러한 제한성을 극복하기 위하여 고성능DNA배렬분석을 통한 메타게놈학적분석법이 개발되어 적극 리용되고있다. 실패로 뜨거운 온천[93-96]과 같은 고온생태계에 대한 메타게놈학적분석이 진행되었다. 결국 오늘날 메타게놈학적분석은 특정한 환경의 미생물집단으로부터 내열성효소를 생성하는 호열성생물들을 동정하는데서 필수적인 수법으로 되고있다. 비록 배양은 불가능하지만 극단환경미생물들로부터 내열성셀룰라제[97], 당질과 관련한 내열성효소[98], 그밖의 내열성효소들[99]이 메타게놈학적수법으로 얻어졌다.

다음세대배렬분석법의 발전으로 배렬분석원가와 시간이 절약되고 16S rRNA에 기초한 생물다양성연구의 질이 개선됨으로써 더 많은 생태계에 대한 메타게놈학적분석이 가능해졌다. 그리고 올리고뉴클레오타이드탐침을 설계하고 메타게놈서고와 잡종화시킨 다음 탐침이 결합된 DNA 단편에 대한 다음세대배렬분석을 진행하고있다.[15] 한 연구집단은 농업용토지속의 당질관련 효소와 프로테아제들을 암호화하는 기능성유전자들의 폭넓은 다양성을 조사하는 방법을 제기하였는데 이 방법이 호열성미생물집단의 조사에도 효과적으로 적용될수 있다.[100]

생물산업과 식료품가공에 리용되는 대표적인 내열성효소는 표 2에 묶어주었고 환경수복에 리용되는 대표적인 내열성효소는 표 3에 묶어주었다.[17, 121]

특히 내열성효소들은 잘 분해되지 않는 유기폐기물들을 분해 및 무독화시켜 환경을 수복하는데 널리 리용할수 있다.[119] 일반적으로 산화환원효소(옥시게나제, 라카제, 페록시다제)와 물작용분해효소(리파제, 셀룰라제, 카르복실에스테라제, 포스포트리에스테라제, 할로알칸데할로게나제)가 오염물질의 생물분해에 리용된다.[68, 120] 이러한 효소들의 열안정성을 높이면 생물기술에 의한 환경수복(environmental bioremediation)의 효율은 훨씬 높아질것이다.

표 2. 생물산업과 식료품가공에 리용되는 대표적인 내열성효소

호열성미생물	대응하는 내열성효소와 응용	작용 온도/°C	참고 문헌
<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	내열성크실라나제(Xyn10A)를 리용하여 증기처리한 리그노섬유소로부터 점도를 낮추는 방법으로 많은 량의 당을 생산하였다.	85	101
<i>Geobacillus</i> sp WSUCF1	호열성미생물을 리용하여 콘도랭이피(벼과식물)로부터 생물연료용수소를 생산하였다.	60	102
<i>Acinetobacter pittii</i> MASK 25	내열성크실라나제를 리용하여 농부산물로부터 크실로펜토즈와 크실로헥소스를 생산하였다.	50	103
<i>Anoxybacillus</i> sp. HBB16	여러 공업공정에 적합한 새로운 내열성알카리리파제를 발견하였다.	55	104
<i>Bacillus subtilis</i> TBS2	내열성 $\beta$ -만나나제로 만난을 물작용분해하여 기능성식품을 위한 만노올리고당을 생산하였다.	20~100	105
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	유전자조작한 호열성미생물을 리용하여 목재로부터 생물연료용에타놀을 생산하였다.	55	106
<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	내열성 $\beta$ -글루코시다제(TthBgl)를 리용하여 셀로비오즈로부터 많은 량의 포도당을 생산하였다.	85	107
<i>Thermus thermophilus</i>	호열성세균 <i>T. thermophilus</i> 가 기능에 기초한 내열성효소검출의 좋은 숙주로 된다고 제안하였다.	70	108
<i>Aspergillus fumigatus</i> KIBGE-IB33	목감자로부터 포도당을 다량생산하고 계속하여 <i>Saccharomyces</i> 에 의한 알콜발효를 시켰는데 에타놀로의 전환률이 84%로서 상당히 높았다.	65	109
<i>Sporotrichum thermophile</i>	기름을 뺀 마풍수캐묵으로부터 내열성크실라나제를 생산하였다.	45	110
<i>Humicola insolens</i> Y1	글리코실히드롤라제 10족에 속하는 3개의 새로운 내열성크실라나제유전자( <i>xynA</i> , <i>xynB</i> , <i>xynC</i> )를 동정하고 그것들의 생화학적특성을 연구하였다. 양조공업에서의 리용가능성을 검토하였다.	70~80	111

표 3. 환경수복에 리용되는 대표적인 내열성효소

내열성효소	분리원천	최적 온도/°C	적용대상	참고 문헌
라카제	흰부패진균	50	천의 물감을 분해 및 무독화	112
라카제	<i>Streptomyces ipomoeae</i> CECT 3341	60	천의 물감인 산성오렌지63물감을 분해 및 무독화	113
라카제	<i>Setosphaeria turcica</i>	60	2,2'-아지노비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산)을 분해	114
포스포트리에스테라제 류사락토나제	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	72	유기린산을 처리	115
알칸히드록실라제	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	72	헥산, 헥사데칸, 모터기름과 같은 석유탄화수소를 분해	116
카르복실에스테라제	<i>Pseudomonas synxantha</i> PS1	60	피레트린계살충제를 분해	117
라카제	<i>Anoxybacillus</i> sp. UARK-01	90	풍고적의 탈색	118

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 52, 6, 140, 주제95(2006).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 52, 11, 131, 주제95(2006).
- [3] 김일성종합대학학보(자연과학), 53, 10, 128, 주제96(2007).
- [4] 김일성종합대학학보(자연과학), 45, 8, 81, 주제88(1999).
- [5] 김일성종합대학학보 생명과학, 64, 4, 92, 주제107(2018).
- [6] 김광원; 일용품공업, 5, 30, 1996.
- [7] 고선영 등; 생물학, 3, 4, 주제94(2005).
- [8] 황덕만 등; 생물학, 2, 21, 주제88(1999).
- [9] T. D. Camenisch et al.; Mini Rev. Med. Chem., 8, 7, 669, 2008.
- [10] E. Check; Nature, 438, 417, 2005.
- [11] J. Gomes et al.; Food Technol. Biotechnol., 42, 223, 2004.
- [12] R. Sinha et al.; Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles, Springer, 859~880, 2013.
- [13] S. Elleuche et al.; Curr. Opin. Biotechnol., 29, 116, 2014.
- [14] F. Sarmiento et al.; Front. Bioeng. Biotechnol., 3, 148, 2015.
- [15] M. E. DeCastro et al.; Front. Microbiol., 7, 1521, 2016.
- [16] R. Wohlgemuth et al.; Biotechnol. Adv., 36, 2077, 2018.
- [17] S. Kumar et al.; Bioresour. Technol., 278, 372, 2019.
- [18] H. Atomi; Curr. Opin. Chem. Biol., 9, 166, 2005.
- [19] D. Mehta et al.; Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophile, Springer, 3~60, 2013.
- [20] A. D. Frock et al.; Curr. Opin. Chem. Eng., 1, 363, 2012.
- [21] T. D. Brock et al.; Arch. Mikrobiol., 84, 54, 1972.
- [22] K. O. Stetter; Extremophiles, 10, 357, 2006.
- [23] K. O. Stetter; Extremophiles Handbook, Springer, 403~425, 2011.
- [24] T. Imanaka et al.; Chem. Rec., 2, 149, 2002.
- [25] M. S. Urbietta et al.; Biotechnol. Adv., 33, 633, 2015.
- [26] B. A. Kikani et al.; Int. J. Biol. Macromol., 48, 676, 2011.
- [27] Y. K. Kim et al.; Bioresour. Technol., 82, 157, 2002.
- [28] H. Shi et al.; Biotechnol. Biofuels, 6, 26, 2013.
- [29] R. Cannio et al.; Extremophiles, 8, 117, 2004.
- [30] M. Kataoka et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 2973, 2014.
- [31] A. Toplak et al.; Appl. Environ. Microbiol., 79, 5625, 2013.
- [32] C. F. Hobel et al.; Extremophiles, 9, 53, 2005.
- [33] E. Andronopoulou et al.; Extremophiles, 7, 43, 2003.
- [34] M. Royter et al.; Extremophiles, 13, 769, 2009.
- [35] D. W. Lee et al.; FEMS Microbiol. Lett., 179, 393, 1999.
- [36] R. Shi et al.; Bioresour. Technol., 142, 338, 2013.
- [37] J. D. Bok et al.; Appl. Environ. Microbiol., 64, 4774, 1998.

- [38] H. Wu et al.; *Protein Expr. Purif.*, **95**, 22, 2014.
- [39] N. Ahmad et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 1108, 2014.
- [40] W. F. Li et al.; *Biotechnol. Adv.*, **23**, 271, 2005.
- [41] H. K. Liang et al.; *Proteins*, **59**, 58, 2005.
- [42] A. Karshikoff et al.; *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 550, 2001.
- [43] H. Nakayama et al.; *J. Mol. Biol.*, **365**, 362, 2007.
- [44] J. Littlechild et al.; *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*, Springer, 481~507, 2013.
- [45] J. A. Littlechild et al.; *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 1558, 2007.
- [46] P.W. Goodenough et al.; *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 655, 1991.
- [47] C. N. Pace; *J. Mol. Biol.*, **226**, 29, 1992.
- [48] Y. T. Takahashi et al.; *Biochemistry*, **45**, 11005, 2006.
- [49] M. Samson et al.; *Enzyme Microb. Technol.*, **119**, 10, 2018.
- [50] M. Beeby et al.; *PLoS Biol.*, **3**, e309, 2005.
- [51] C. Vieille et al.; *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6291, 2001.
- [52] I. A. Kataeva et al.; *Biochem. J.*, **372**, 151, 2003.
- [53] X. X. Zhou et al.; *Amino Acids*, **34**, 25, 2008.
- [54] P. Argos et al.; *Biochemistry*, **18**, 5698, 1979.
- [55] C. Vieille et al.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 1, 2001.
- [56] M. E. Bruins et al.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90**, 155, 2001.
- [57] M. J. Thompson et al.; *J. Mol. Biol.*, **290**, 595, 1999.
- [58] R. M. Daniel et al.; *Protein Adaptation in Extremophiles*. Nova Science Publishers, 1~34, 2008.
- [59] H. Yu et al.; *Biotechnol. Adv.*, **32**, 308, 2014.
- [60] R. J. Russell et al.; *Biochemistry*, **36**, 9983, 1997.
- [61] A. Corazza et al.; *Proteins*, **62**, 64, 2006.
- [62] N. Empadinhas et al.; *Int. Microbiol.*, **9**, 199, 2006.
- [63] E. Sarvandi-Dehghanpoor et al.; *Int. J. Biol. Macromol.*, **119**, 1036, 2018.
- [64] M. M. Gromiha et al.; *Proteins*, **70**, 1274, 2008.
- [65] A. Lakijadeh et al.; *Adv. Stud. Biol.*, **3**, 63, 2011.
- [66] L. J. Clarke et al.; *Synth. Syst. Biotechnol.*, **1**, 1, 2016.
- [67] X. Liu et al.; *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 187, 2018.
- [68] B. Sharma et al.; *J. Environ. Manage.*, **210**, 10, 2018.
- [69] A. Villalobos et al.; *BMC Bioinformatics*, **7**, 285, 2006.
- [70] Y. Lu; *Synth. Syst. Biotechnol.*, **2**, 23, 2017.
- [71] F. Sunden et al.; *eLife*, **4**, e06181, 2015.
- [72] M. Irfan et al.; *Enzyme Microb. Technol.*, **111**, 38, 2018.
- [73] L. Tang et al.; *Mol. Reprod. Dev.*, **85**, 250, 2018.
- [74] Z. Tang et al.; *Enzyme Microb. Technol.*, **108**, 74, 2018.
- [75] A. K. Dangi et al.; *Front. Pharmacol.*, **9**, 630, 2018.
- [76] R. Yadav et al.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **58**, 1735, 2018.
- [77] K. H. Lee et al.; *Biotechnol. J.*, **8**, 1292, 2013.

- [78] J. G. Perez et al.; Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 8, 12, 2016.
- [79] B. J. Des Soye et al.; ACS Synt. Biol., 7, 2245, 2018.
- [80] D. Foshag et al.; New Biotechnol., 40, 245, 2018.
- [81] H. Wang et al.; Synt. Biol., 3, ysy003, 2018.
- [82] J. Wang et al.; Starch, 70, 1700265, 2018.
- [83] K. Tran et al.; Biotechnol. Bioeng., 115, 92, 2018.
- [84] A. P. Welegedara et al.; Bioconjug. Chem., 29, 2257, 2018.
- [85] W. H. Zhang et al.; Curr. Opin. Struct. Biol., 23, 581, 2013.
- [86] A. Crnković et al.; Croat. Chem. Acta, 89, 163, 2016.
- [87] O. Vargas-Rodriguez et al.; Curr. Opin. Chem. Biol., 46, 115, 2018.
- [88] A. Zemella et al.; Chem. Bio. Chem., 16, 2420, 2015.
- [89] E. D. Carlson et al.; Biotechnol. Adv., 30, 1185, 2012.
- [90] Y. Shimizu et al.; Methods, 36, 299, 2005.
- [91] N. Michel-Reydellet et al.; J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 9, 26, 2005.
- [92] R. M. Berka et al.; Nat. Biotechnol., 29, 922, 2011.
- [93] A. Ghelani et al.; Genom. Data, 4, 54, 2015.
- [94] R. Gupta et al.; Appl. Biochem. Biotechnol., 168, 1681, 2012.
- [95] O. López-López et al.; Front. Microbiol., 6, 1291, 2015.
- [96] N. Sangwan et al.; Environ. Microbiol. Rep., 7, 812, 2015.
- [97] J. -J. Escuder-Rodríguez et al.; Microorganisms, 6, 66, 2018.
- [98] G. Kaushal et al.; Int. J. Biol. Macromol., 119, 882, 2018.
- [99] F. Berini et al.; FEMS Microbiol. Lett., 364, fmx211, 2017.
- [100] L. Manoharan et al.; DNA Res., 22, 451, 2015.
- [101] L. Long et al.; Bioresour. Technol., 257, 334, 2018.
- [102] M. Bibra et al.; Bioresour. Technol., 266, 232, 2018.
- [103] A. Purohit et al.; Bioresour. Technol., 244, 793, 2017.
- [104] Z. B. Bakir et al.; Chem. Biochem. Eng. Q., 31, 303, 2017.
- [105] Z. Luo et al.; Appl. Biochem. Biotechnol., 182, 1259, 2017.
- [106] C. D. Herring et al.; Biotechnol. Biofuels, 9, 125, 2016.
- [107] L. Long et al.; Bio. Res., 11, 3165, 2016.
- [108] B. Leis et al.; Front. Microbiol., 6, 275, 2015.
- [109] S. Pervez et al.; BMC Biotechnol., 14, 49, 2014.
- [110] A. Sadaf et al.; Bioresour. Technol., 153, 126, 2014.
- [111] Y. Du et al.; Bioresour. Technol., 130, 161, 2013.
- [112] O. Yesilada et al.; Mycoremediation and Environmental Sustainability, Springer, 121~153, 2018.
- [113] A. Blázquez et al.; Saudi J. Biol. Sci., 5, 20, 2018.
- [114] S. Ma et al.; J. Basic Microbiol., 58, 68, 2018.
- [115] O. F. Restaino et al.; BMC Biotechnol., 18, 18, 2018.
- [116] T. Kadri et al.; Int. J. Biol. Macromol., 112, 230, 2018.
- [117] X. Cai et al.; Sci. Rep., 7, 3461, 2017.
- [118] T. H. Al-kahem Al-balawi et al.; Curr. Microbiol., 74, 762, 2017.

- [119] N. Raddadi et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., **99**, 7907, 2015.  
[120] A. K. Dangi et al.; Crit. Rev. Biotechnol., **39**, 79, 2018.  
[121] H. Han et al.; Bioresour. Technol., **279**, 350, 2019.  
[122] 相川知宏 等; Jpn. J. Lactic Acid Bacteria, **26**, 1, 14, 2015.

주제 110(2021)년 1월 5일 원고접수

## **Studies and Application of Thermozyms**

*Kim Kwang Won*

Thermozyms derived from thermophilic bacteria and thermophilic archaea offer unique advantages such as high catalytic activity, excellent thermostability, and significant resistance to chemical denaturants, resulting in diverse industrial applications including food, medicament, detergent, paper processing and biofuel production, and environmental bioremediation.

Keywords: thermozyms, thermophilic bacterium, thermophilic archaeon, synthetic biology, gene editing, CRISPR/Cas, environmental bioremediation