

효율적인 Levan 합성을 위한 Histidine & Ni로 기능화된 자성 나노입자 제조

김규남 · 김다인 · 김승현 · 박동훈 · 이우일*
건양대학교 의료신소재학과
*lee0519@konyang.ac.kr

Preparation of Magnetic Nanoparticles Functionalized with Histidine & Ni for Efficient Levan Synthesis

Ku-Nam Kim, Da-In Kim, Seung-hyun Kim, Dong-hoom Park, Woo-Yiel Lee*
Department. of Biomedical Materials, Konyang University

천연 프럭탄인 levan은 β -2,6 글리코시드 결합으로 연결된 고분자로서 제약 및 생명공학 산업에서 널리 사용된다. 본 연구에서는 유전자 재조합을 통하여 *Bacillus subtilis* 유래의 levansucrase를 *Escherichia coli*를 이용하여 발현하였으며, 발현된 재조합 효소를 Fe_3O_4 자성 나노입자 (MNP)의 표면에 고정화하였다. Levan 제조공정에서 반응 완료 후 효소를 제거하기 위해서 Ni-NTA chromatography를 적용하여 재조합 Levansucrase의 N-말단에 있는 6 x His tag와의 배위결합으로 수행되는 정제 과정이 필요하다. 자성나노입자에 His과 Ni를 고정화 함으로서 보다 효과적인 정제과정 및 효소의 회수를 위한 기능화된 자성 나노입자를 합성하고 입자들의 특성을 조사하였다.

1. 서 론

레반은 천연물질로 유산균 생육촉진과 유해 미생물의 생육 억제, 면역증강력 등이 뛰어나 의약품, 화장품, 사료 등 생물 산업 전반에 활용된다. 하지만 현재까지 상업적 생산이 잘 이루어지지 않고 있어 산업적으로 대량생산 할 수 있는 경제적이면서 효율적인 생산기술 방법이 크게 개발되어 있지 않은 상태로 필요성이 강조되고 있는 상황이다.

레반 제조시 levansucrase가 sucrose와 반응하여 오탄당을 붙이면서 고분자를 형성하여 고분자를 형성하게 되는데 sucrose의 반응이 끝나면 levansucrase가 고분자인 레반의 당 사슬을 잘라 레반의 합성을 어렵게 하기 때문에 반응이 완료되면 levansucrase를 즉각적으로 빼내줘야 한다.

기존 레반을 제조하는 공정단계에서는 레반만을 얻기 위해 Ni-NTA로 levansucrase의 말단의 6x-His Tag를 잡아 정제하는 과정이 필요한데 비용이 비싸고 시간도 오래걸리는 단점이 존재한다.

이 한계를 극복하기 위해 나노 자기 흡착제(자성나노입자)를 이용하여 높은 표면/부피 비율로 더 빠른 결합속도와 큰 흡착능력을 제공하고 외부 자석이 없을 때 응집을 방지하고 용액에서 빠르게 재분산 시킬 수 있다.

본 설계는 자성나노입자를 합성하고 Fe_3O_4 표면에 공유결합으로 고정된 히스티딘인 $Fe_3O_4@Histidine$ 구조에서 히스티

딘과 니켈 사이의 강한 상호작용을 통해 Ni^{2+} 이온을 포획할 수 있어 히스티딘과 니켈로 기능화된 자성 나노입자를 제조하였다.

기존 공정에서 levansucrase의 말단의 6xhis를 Ni-NTA로 정제하는 과정에서 자성나노입자에 히스티딘과 니켈을 고정함으로써 정제과정을 생략하여 공정을 최소화하고 경제적으로 비용을 절감할 수 있고 이미다졸을 첨가시 니켈은 6x his 보다 이미다졸그룹과 친화성이 높아 재활용이 가능하다는 장점이 존재한다.

Levan은 최근 항종양성, 항알레르기성 및 세포독성물질에 대한 세포막 투과성을 촉진시키는 작용이 주목 받으며 산업적 생산이 기대되고 있다. 또한 낮은 점도, 높은 용해도, 생체적합성, 높은 산 가수분해성 공업용 gum에서의 유화제, 안정제, thickener로 활용되며 dextran과 같이 혈장 증진제 (blood plasma extender)로서 사용될 수 있는 가능성을 갖고 있다.

2. 실험방법

2.1 대장균에서 재조합 Levansucrase 생산

유전자 SacB를 얻기 위해 *B.subtilis*의 gDNA를 Template로 이용하여 중합효소연쇄반응을 진행하였다. PCR mixture

는 0.2mL PCR tube에 멸균 증류수, 10x PCR Buffer, 10mM dNTP mixture, *B. subtilis* gDNA, pF Primer, pR Primer와 Taq polymerase를 순서대로 혼합하여 총 부피가 50 μ L가 되도록 하였다. 각 단계의 온도와 시간에 대한 조건은 결과 3.1에 기재하였고 증폭 반응의 결과는 1% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

2.2 pElevB-His 발현 vector 구축

정제된 sacB와 vector PET-25b를 각각 BamHI 과 Xho I 를 37°C 에서 1시간 반응시켜 절단하였다. 절단된 DNA 단편을 연결하기 위해 삽입DNA와 vector를 T4 ligase와 혼합하여 16°C 에서 1시간 반응시킴으로써 재조합 vector를 구축하였다.

형질전환을 위해 사용된 DH5a를 반응능세포로 제작하기 위해 CaCl₂를 이용하여 전처리하였다. 제조된 DH5a에 재조합 pElevB-His를 혼합한 뒤 heat-shock 방법으로 형질전환을 시도하였다. 100 μ L의 competent cell에 ligation 반응액 전량을 넣어 얼음에서 30분간 안정화하였으며, 이후 42°C 에서 1분간 열 충격을 가했고 형질전환체를 선별하기 위하여 항생제 ampicillin을 첨가한 SOB 배지에 도말하여 밤새 배양 후 1차 선별하였으며, colony PCR 과 제한효소 반응을 통하여 pElevB-His 형질전환체를 최종 선별하였다.

2.3 대장균으로부터 재조합 levansucrase의 발현 및 정제

재조합 levansucrase 단백질을 얻기 위해 pElevB-His의 형질전환이 완료된 BL21(DE3)를 Amp가 포함된 SOB배지에 접종하여 37°C, 175 rpm에서 밤새 배양하였다. 접종된 균주는 다음날 동일한 배지에 1:100 (v/v)의 비율로 배양했고, O.D600 값이 0.6이 되었을 때 IPTG 최종 농도를 1.0 mM로 조절해 첨가하여 단백질의 발현을 유도하였다.

배양기에서 6시간 동안 배양한 후 발현이 끝난 균주를 4,000 \times g 에서 15분 동안 centrifuge (2236R, GYROZEN)를 이용하여 상등액과 pellet을 회수하였으며, 각각 SDS sample buffer로 현탁시킨 후 SDS-PAGE를 실시하였다.

2.4 Fe₃O₄ 자성나노입자 합성

FeCl₂ · 4H₂O 와 FeCl₃ · 6H₂O를 용매로 물에 용해시켜 90°C에서 10 min 가열한 다음 HCl 2.5mL를 용액에 첨가 후 침전물이 형성될시 용액의 pH12가 도달할 때까지 NaOH(25 wt%)를 용액에 적가를 하였으며 이후 90°C 부근 30분 동안 교반 후 생성된 침전물을 28°C로 냉각하여 50% ethanol로 세척후 초원심분리기로 세척을 반복하고 상온에서 보관하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Levansucrase의 SacB 증폭 확인

*B.subtilis*의 gDNA로부터 PCR를 실행한 후 원하는 DNA가 증폭이 되었는지 알기 위해서 Agarose gel electrophoresis를 사용함으로써 Levansucrase의 유전자인 SacB와 같은 크기(약 1500bp)의 band가 관찰되어 SacB가 증폭되었음을 확인할 수 있었다.

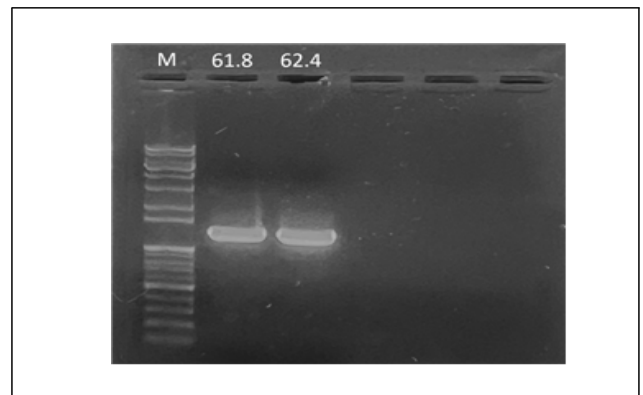


Figure 1. Agarose gel electrophoresis (Lane M: 1kb Plus 100bp DNA ladder Marker, Lane 1: SacB by annealing Temp 61.8°C, Lane 2: SacB by annealing Temp 62.4°C).

3.2 pElevB 의 Transformation 확인

재조합 유전자인 pElevB를 만들기 위해 제한효소 처리를 해준 pET-25b와 SacB를 Ligation과 열 충격 방식을 실행후 *E.coli* BL21(DE3)균주를 사용하여 SOB배지에 spreading 시킨 후 37°C, 16h 동안 Incubator에 보관하였다.

Transformation이 된 균주인 경우 항생제인 Ampicillin이 첨가된 배지에서 Colony가 생성되지만 Transformation이 되지 않은 균주는 Ampicillin이 첨가된 배지에서 Colony가 생성되지 않기 때문에 Transformation이 된 균주만이 Colony가

생성된다.

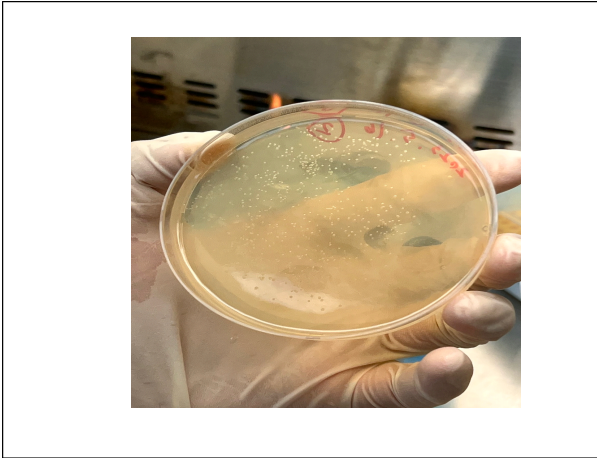


Figure 2. pLevB/BL21(DE3) into which the recombinant vector is inserted

3.3 pELevB 벡터 발현

재조합 pELevB 벡터의 발현확인을 위해 Comptent cell E.coli BL21(DE3)균주를 사용하여 Transformation을 통해서 얻은 임의의 colony 10개를 취하여 Colony PCR을 진행하였으며, Colony PCR 온도 조건으로는 다음과 같이 설정하였다. (Denaturation 95°C,30sec / Annealing 60-65°C, 30sec / Extension 72°C, 1min 30sec)

Figure 3과 Figure 4에서 10개의 Colony 모두 Signal peptide 포함한 SacB DNA 크기인 약 1419 bp에서 증폭이 된 것을 알 수 있으며 결과적으로 재조합 pELevB 벡터가 발현되었음을 확인하였으며 Figure 5의 SDS-PAGE를 진행한 결과로서 모든 Lane에서 단일밴드가 아닌 여러 가지 밴드를 관찰할 수 있었기 때문에 우리가 원하는 단백질 크기가 약 50 kDa으로 추정됨에도 불구하고 결과를 해석하기에는 밴드의 위치와 색깔이 불분명하여 수치상으로 결과를 해석할 수 없었다.

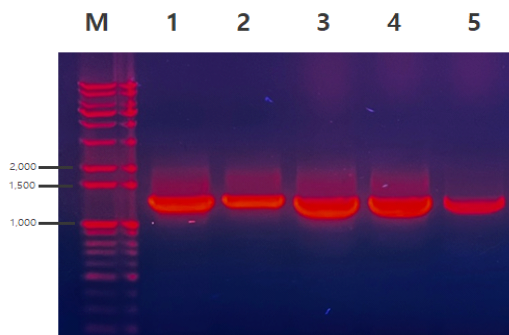


Figure 3. Colony PCR pELevB/BL21(DE3). (Lane M: DNA Marker, Lane 1: pELevB colony 1, Lane 2: pELevB colony 2, Lane 3: pELevB colony 3, Lane 4: pELevB colony 4, Lane 5: pELevB colony 5).

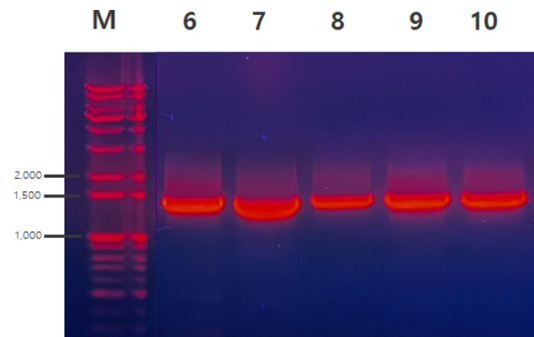


Figure 4. Colony PCR pELevB/BL21(DE3). (Lane M: DNA Marker, Lane 6: pELevB colony 6, Lane 7: pELevB colony 7, Lane 8: pELevB colony 8, Lane 9: pELevB colony 9, Lane 10: pELevB colony 10).

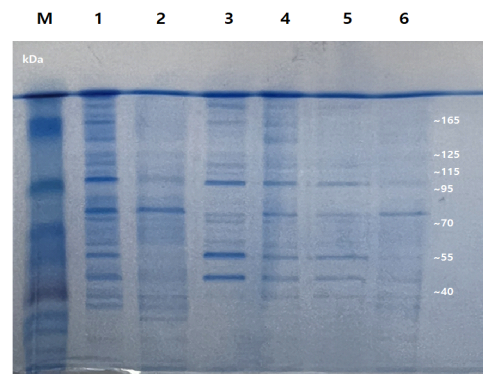


Figure 5. SDS-PAGE analysis result. (Lane M: Protein Marker, Lane 1: Before Transformat ion 1-4, Lane 2: Inclusion 1-4, Lane 3: Soluble 1-4, Lane 4: Before Trans formation 2-1, Lane 5: Inclusion 2-1, Lane 6: Soluble 2-1).

3.4 Fe₃O₄ 자성나노입자 합성

Fe₃O₄ MNP와 levansucrase가 결합된 Fe₃O₄ MNP의 형태를 SEM을 이용하여 조사하였다. Fig. 6은 SEM 측정 결과로 Fe₃O₄ MNP의 표면은 효소 고정 전후에 매끄러운 구형을 가지며 자기 쌍극자 모멘트로 인해 응집된 것처럼 보였다.

합성된 MNP와 효소가 결합된 MNP의 내부 구조를 분석하기 위해 TEM 분석을 수행하였다. Fig. 7의 TEM 이미지에서 확인된 MNP의 평균 크기는 약 20 nm로, 효소를 고정한 후 약 30 nm의 입자 크기로 나타났다. 입자 크기는 작을수록 비표면적이 커져서 지지체의 표면에 더 많은 효소가 고정될 수 있으며, 기질 및 물질 확산 제한을 최소화하기 때문에 지지체의 핵심 요소 중 하나이다.

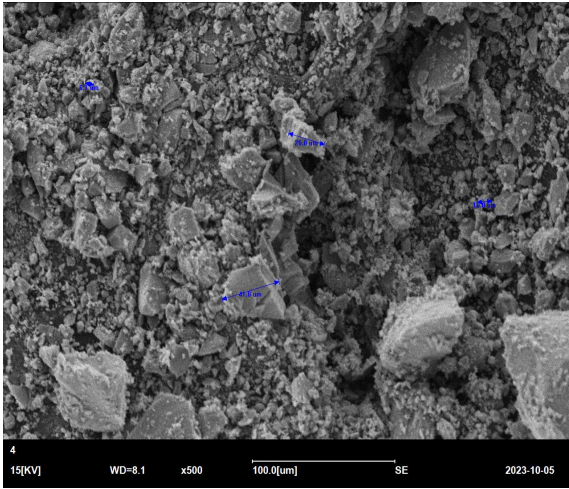


Figure 7. Analysis of MNP size at 500 times with Mini-SEM.

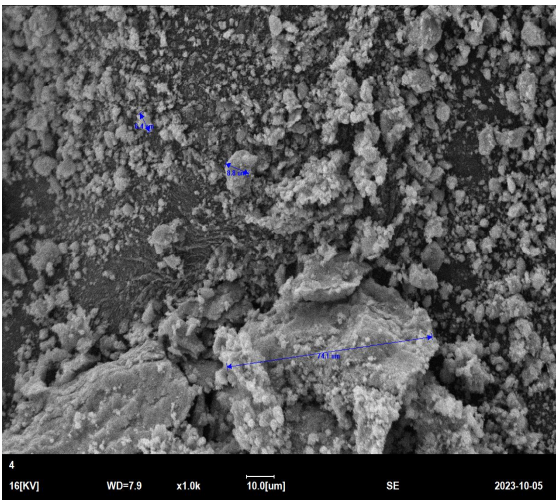


Figure 8. Analysis of MNP-His size at 1000 times with Mini-SEM.

4. 결론

본 연구에서는 제조합 Levansucrase와 Fe_3O_4 자성나노입자 제조를 통해 니켈입자에 고정화된 자성나노입자에 Levansucrase 합성을 목적으로 진행한 연구이다.

1. Levansucrase의 PCR 결과 확인을 통해 Levansucrase의 유전자인 SacB와 같은 크기(약 1500bp)의 band가 관찰되어 SacB가 증폭되었음을 확인할 수 있었다.
2. Transformation을 통해 Ampicillin이 첨가된 배지에서 Colony가 생성됨을 확인할 수 있었다.
3. pLEvB 벡터 발현확인을 측정하기 위해 Colony PCR을 진행하였고 Colony 모두 Signal peptide 포함한 SacB

DNA 크기인 약 1419bp에서 증폭이 된 것을 알 수 있으며 결과적으로 제조합 pLEvB 벡터가 발현되었음을 확인하였다.

4. SDS PAGE를 통해 DNA 보다 크기가 작은 단백질들의 분류를 진행하였으며 Inclusion과 Soluble의 결과물을 확인할 수 있었다.
5. $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 와 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 용해시켜 냉각기를 통해 침전물을 형성해 초원심분리기로 세척을 진행한 후 자성나노입자가 발현됨을 확인하였다.

본연구는 Levansucrase와 자성나노입자에 Histidine을 표면 개질하여 Levansucrase와 니켈입자를 고정화시켜 Levan의 합성반응이 완료되고 난 후 제조합 levansucrase를 즉각적으로 회수하여 levansucrase의 재사용 및 정제과정이 생략된 효율적인 Levan 합성의 방법을 제공하고 있다.

참고 문헌

- [1] E. T. Öner, L. Hernández, J. Combie, “Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects”, *Biotechnology Advances*, Vol.34, No.5, pp.827-844, Sep-Oct. 2016.
- [2] C. S. Hundschell, F. Jakob, A. M. Wagemans, “Molecular weight dependent structure of the exopolysaccharide levan”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 161, pp.398-405, Oct. 2020.
- [3] S. A. Arvidson, B. T. Rinehart, F. Gadala-Maria, “Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp.”, *Carbohydrate Polymers*, Vol.65, No.2, pp.144-149, Jul. 2006.
- [4] Y. W. Han, “Microbial Levan”, *Advances in Applied Microbiology*, Vol.35, pp.171-194, 1990.