

## 재조합 효모를 이용한 endoinulinase의 생산 특성

한지혜, 이은미, 윤영미, 이현철\*, 정봉우, 채건상\*\*

전북대학교 화학공학부, 한려대학교 신소재공학과\*, 전북대학교 생물과학부\*\*

전화 (0652) 270-2309, FAX (0652) 270-2306

### Abstract

The *INU2* gene encoding an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* was expressed by the *Kluyveromyces marxianus INU1* promoter in a *SUC2*-deleted *Saccharomyces cerevisiae* to produce the endoinulinase free of an exoinulinase and an extracellular invertase in the culture medium. When inulin was included in the medium, a recombinant yeast strain produced the sufficient amount of the enzyme to make a halo around its colony. An expression of endoinulinase was dependent on the culture temperature and shaking. The highest expression of endoinulinase was observed at 30°C, and 150rpm.

### 서론

Inulin은 fructose 분자들이  $\beta$ -2,1결합으로 연결되어 있는 직선 모양의 다당류로서 중합도는 2에서 35정도이며 한쪽 말단에는 glucose가  $\alpha$ -1,2결합으로 되어있다.<sup>1)</sup> Inulin 가수분해를 촉매하는 효소인 inulinase는 각종 식물과 미생물 등 자연에 널리 분포되어 있으며 기질특이성과 효소 작용 양식에 따라 높은 invertase 활성을 함께 보유하고 있는 exo형 inulinase와 invertase 활성이 거의 없거나 낮은 endo형 inulinase로 구분되고 있다.<sup>2)</sup> 이 중 endoinulinase는 inulin 내부의 fructose  $\beta$ -2,1결합을 가수분해하므로 inulo-oligo당으로 불리는 fructose 만의 중합 oligo당과 비환원성 말단에 glucose가 부착된 fructo-oligo당을 생산한다.<sup>3)</sup> 이렇게 생산된 fructo-oligo당은 bifidobacteria의 증식, 치아 부식 방지, 혈 중 콜레스테롤과 당의 농도를 낮추는 등 여러 가지 생물학적으로 중요한 기능을 보이고 있어 유럽의 많은 국가에서 식품첨가제나 의약품으로 광범위하게 사용되고 있다.

Fructo-oligo당은 2가지 방법으로 생산할 수 있다. 산 또는 효소, 즉 endoinulinase에 의해 inulin을 가수분해 하는 방법과 fructosyltransferase의 활성에 의해 하나의 fructose 단위가 sucrose 분자로 옮겨짐에 따라 sucrose가 합성되는 방법이 있다. fructosyltransferase를 사용하면 생성된 glucose 분자들에 의한 효소활성화의 억제 때문에 fructo-oligo당을 55% 이상 생산 할 수 없다. 그러므로 고농도의 fructo-oligo당을 얻기 위해서는 glucose를 제거하는 몇 가지의 정제 단계가 필수적이고 그

oligo당을 얻기 위해서는 glucose를 제거하는 몇 가지의 정제 단계가 필수적이고 그에 따라 경비는 증가하게 된다. 반면에 endoinulinase를 사용하면 한번의 단계로 90% 이상의 fructo-oligo당을 생산 할 수 있다.

Inulin은 치커리, 아스파라거스, 돼지감자 등을 포함한 천여종의 식물에 존재한다. 이들은 척박한 토양에서도 잘 생육하고 감자나 옥수수보다 수득량이 많으며 상대적으로 질병에 대한 저항력도 크다. inulin의 함량은 식물 질량의 30%정도이다.

*Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum* 등의 균주는 동시에 endoinulinase와 exoinulinase를 생산하지만 *Kluyveromyces marxianus*는 단지 exoinulinase만 생산한다. endoinulinase에 의해 inulin으로 부터 sucrose 또는 glucose가 없는 fructo-oligo당만을 생산하기 위해 endoinulinase는 invertase, fructosyltransferase 또는 exoinulinase 같은 다른 효소가 없어야 하며 GRAS생물로부터 얻을 수 있어야한다. 그러나 invertase나 exoinulinase는 endoinulinase와 구조가 비슷하여 함께 생산된 invertase나 exoinulinase로부터 분리하기가 어렵다. 만약 세포외로 invertase, fructosyltransferase 그리고 exoinulinase를 분비하지 못하는 숙주 내에서 발현된다면 endoinulinase는 쉽게 분리될 수 있다.<sup>4)</sup>

본 실험에서는 endoinulinase의 생산성 향상을 위해 플라스크 배양시 재조합 효모의 특성을 살펴보고 그에 따른 최적 배양조건을 알아보고 발효기 배양을 위한 기초자료 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에서는 endoinulinase를 invertase나 exoinulinase가 없는 상태로 생산하기 위하여 *Aspergillus ficuum*의 endoinulinase를 암호화하는 *INU2*는 *SUC2*를 제거한 *Saccharomyces cerevisiae*를 숙주로 했다. 또한 이 효모에서 endoinulinase를 발현시키기 위해 효모에 강하게 작용하는 *Kluyveromyces marxianus*의 exoinulinase의 promoter인 *INU1*를 사용하고 multi-copy plasmid인 pYESINU2를 벡터로 이용하여 발현 벡터를 제조하여 실제 효모에 도입하였다. 효모의 형질전환체의 선별과 보존을 위해서 tryptophan이 없는 YNBCAD배지( 0.67% yeast nitrogen base without amino acid )를 사용하였고 2주마다 계대배양 하였다.

### 배지 및 배양조건

배지의 조성 중 탄소원 및 inducer의 종류와 농도에 따른 endoinulinase의 활성을 비교해 보기 위해 탄소원으로 glucose, fructose, sucrose를 사용하였고 또, inducer를 첨가하고 그 양을 조절하였다.

온도와 교반속도에 따른 플라스크 배양조건을 알아보기 위해서 YPD배지( 1.0%

Yeast extract, 2.0% Bacto-Peptone, 2% D-glucose )에서 온도를 각각 25℃, 30℃, 35℃로 유지하면서 배양하였고, 교반속도에 따른 최적 배양조건을 찾기 위해 30℃의 조건하에서 교반속도를 100rpm, 150rpm, 200rpm으로 다르게 하여 배양했다.

#### 효소활성 측정

YPD 배지에서 72시간 동안 재조합 효모를 배양한 후 배양 배지를 10분 동안 8000rpm으로 원심분리 한 후 상등액 15~30 $\mu$ l를 2%의 inulin이 포함된 고품배지 위에 떨어뜨려 52℃ 배양기에 넣고 halo를 관찰 측정하였고, 100 $\mu$ l 반응부피, 52℃에서 1시간당 1 $\mu$ mol의 inulin이 가수분해 될 수 있는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

#### 결과 및 고찰

5%이 inulin이 포함된 YPS배지에 *S. cerevisiae* YSH 2.64-2c(pR4INU2)를 배양하여 주위에 halo를 관찰하였다. 이는 endoinulinase 발현 벡터가 도입된 효모에서 분비된 endo inulinase가 inulin을 가수분해 한 결과이다.

탄소원으로 glucose, fructose, sucrose를 사용한 결과를 Table 1에 나타내었다. Glucose 2%에 2%의 fructose inducer를 사용한 경우 endoinulinase의 활성이 가장 높았고, sucrose를 사용한 경우는 아주 낮은 활성을 보여 보통 미생물의 공업적 배양 원료로 많이 사용되는 당밀이 사용될 수 없는 단점을 보였다.<sup>3)</sup>

Table 1. The effect of a carbon source and an inducer on the endoinulinase productivity<sup>a</sup>

Carbon Source		Inducer		Conc.enzyme(U/ml)
Glucose	2.0%	None		78.6 $\pm$ 1.6
		Fructose	0.2%(after 12 hr) <sup>b</sup>	80.0 $\pm$ 1.0
		Fructose	2.0%(after 12 hr)	82.0 $\pm$ 0.3
		Sucrose	0.2%(after 12 hr)	73.2 $\pm$ 0.8
		Sucrose	2.0%(after 12 hr)	71.9 $\pm$ 1.0
		Sucrose		74.4 $\pm$ 3.7
Glucose	1.0%	Sucrose	2.0%	54.6 $\pm$ 4.3
Glucose	0.5%	Sucrose	2.0%	25.9 $\pm$ 1.2
Fructose	2.0%	None		78.1 $\pm$ 1.5
Sucrose	2.0%	None		12.6 $\pm$ 1.9

a. All experiments were done in triplicates.

b. Inducers were added after 12 hr of initiation of culture, when indicated.

Otherwise, an inducer was added from the initiation of culture.

Endoinulinase의 발현과 분비에 미치는 배양온도의 영향을 알아보기 위해 배양온도를 25℃에서 35℃로 변화시키면서 재조합 효모를 YPD배지에서 72시간 동안 배양하여 2% inulin plate에서의 halo의 크기를 측정하여 상대적인 활성을 조사했다. 30℃에서 배양된 endoinulinase가 가장 큰 활성을 보였으며(Fig. 1) 교반속도에 따른 endoinulinase의 발현과 분비를 알아보기 위해 교반속도를 100rpm에서 200rpm으로 변화시키면서 배양했다. endoinulinase 발현은 교반 속도에 영향을 받으며 150rpm의 속도로 교반 할 때 가장 큰 활성을 보였다.(Fig. 2)

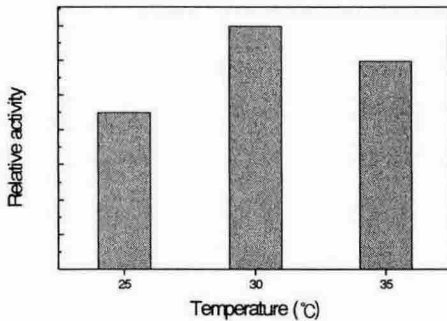


Fig. 1. Effect of temperature on the relative activity.

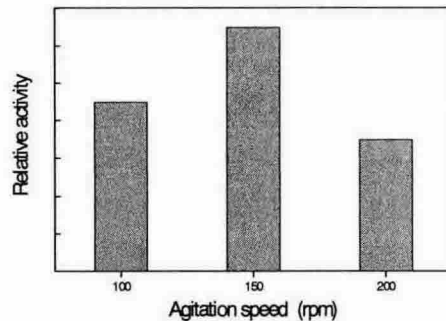


Fig. 2. Effect of shaking on the relative activity.

### 참고문헌

1. 전덕영, 김명희 “돼지감자 중의 inulin 분해효소에 관한 연구” J. Korean Soc. Food Nutr. 17(3) 205~210 (1986)
2. 김경연, 강수일, 김수일 “새로운 endoinulinase 생산 균주의 선발 및 효소의 생산” 한국농화학학회지 Vol 39. No2, 99~103 (1996)
3. 박선규, 최용진 “endo- 및 exo-inulinase를 이용한 inulin 가수분해” Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 19 No1. 52-56 (1991)
4. Hee-Seo Kim, Dong Whan Lee, Eun Ja Ryu, Tai Boong Uhm, Moon Sik Yang, Jung Bae Kim & Keon Sang Chae “Expression of INU2 gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficcum* in *Saccharomyces cerevisiae*” Biotechnology Letters 21 : 621-623 (1999)